

PENGARUH EKSTRAK KULIT MANGGIS (*Garcinia mangostana*) TERHADAP EKSPRESI *E-CADHERIN* DAN HISTOPATOLOGI GINJAL TIKUS (*Rattus novergicus*) MODEL *ACUTE RENAL FAILURE* HASIL INDUKSI STREPTOKINASE

SKRIPSI

Oleh:
OVI PRUDENTIA
115130100111011



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

PENGARUH EKSTRAK KULIT MANGGIS (*Garcinia mangostana*) TERHADAP EKSPRESI *E-CADHERIN* DAN HISTOPATOLOGI GINJAL TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL *ACUTE RENAL FAILURE* HASIL INDUKSI STREPTOKINASE

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
OVI PRUDENTIA
115130100111011



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap Ekspresi
E-cadherin dan Histopatologi Ginjal Tikus (*Rattus novergicus*)
Model *Acute Renal Failure* Hasil Induksi Streptokinase**

**Oleh:
OVI PRUDENTA
115130100111011**

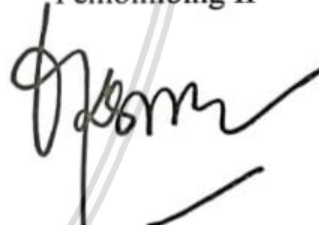
Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 18 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I



Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

Pembimbing II



Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc
NIP. 19820914 200912 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : OVI PRUDENTA
NIM : 115130100111011
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap Ekspresi *E-cadherin* dan Histopatologi Ginjal Tikus (*Rattus novergicus*) Model *Acute Renal Failure* Hasil Induksi Streptokinase

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 18 Juli 2018

Yang menyatakan,



OVI PRUDENTA

NIM. 115130100111011

Pengaruh Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap Ekspresi *E-cadherin* dan Histopatologi Ginjal Tikus (*Rattus novergicus*) Model *Acute Renal Failure* Hasil Induksi Streptokinase

ABSTRAK

Acute Renal Failure (ARF) merupakan kelainan yang ditandai penurunan homeostasis ginjal dengan cepat disebabkan akumulasi toksin. Streptokinase digunakan untuk induksi ARF melalui peningkatan radikal bebas (ROS). Kulit manggis mengandung zat aktif xhanton yang menghambat produksi ROS dan menstimulasi regenerasi melalui *growth factor*. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh ekstrak kulit manggis terhadap ekspresi *E-cadherin* dan histopatologi ginjal tikus model ARF hasil induksi streptokinase. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap menggunakan 20 tikus jantan berumur 12 minggu yang dibagi menjadi lima kelompok: kontrol negatif, kontrol positif (tikus diinduksi streptokinase 6000IU) dan kelompok terapi dengan dosis ekstrak kulit manggis: 200 mg/kgBB (T1); 400 mg/kgBB (T2); dan 600 mg/kgBB (T3). Ekspresi *E-cadherin* diamati menggunakan metode imunohistokimia dan dihitung dengan *Immunomembrane*. Data dianalisa dengan uji ragam *One-way ANOVA* dan uji BNP menggunakan *SPSS for windows 17.0*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak kulit manggis pada hewan model ARF secara signifikan meningkatkan *E-cadherin* pada T1, T2 dan T3. Hal ini didukung pengamatan histopatologi yang menunjukkan penurunan akumulasi sel polimorfonuklear, dan adanya regenerasi korpuskula ginjal pada T1, T2 dan T3 dibandingkan kelompok kontrol positif. Berdasarkan ekspresi *E-cadherin* dan histopatologi ginjal, dosis ekstrak kulit manggis 400 mg/kgBB menunjukkan dosis terapi optimum pada tikus model ARF.

Kata kunci: *Acute Renal Failure*, streptokinase, *Garcinia mangostana*, *E-cadherin*

**The Effect of Mangosteen Pericarp Extract (*Garcinia mangostana*) on the
E-cadherin Expression and Renal Histopathology in Acute Renal
Failure Rats (*Rattus novergicus*) induced by Streptokinase**

ABSTRACT

Acute Renal Failure (ARF) is a syndrome characterized by rapid loss of kidney excretory function caused by toxins accumulation. Streptokinase used to induce ARF by increasing of free radical output (ROS). Mangosteen pericarp consists of xanthenes which can inhibit ROS production and stimulate tissue regeneration by growth factor. This research was conducted to assess the effects of mangosteen pericarp extract (*Garcinia mangostana*) on renal *E-cadherin* expression and histopathology of streptokinase-induced ARF rats. This research used completely randomized design. Twenty adult male rats at three months of age were divided into five groups: negative control; positive control (rats were intravenously injected by streptokinase 6000IU); and treatment groups with different doses of mangosteen extract were 200 mg/kgBW (T1); 400 mg/kgBW (T2); and 600 mg/kgBW (T3). *E-cadherin* expression were observed by immunohistochemistry and quantified by *Immunomembrane* program. Data were analyzed by *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) ($\alpha < 0.05$) by using SPSS 17.0 for Windows. Mangosteen pericarp extract significantly increased *E-cadherin* expression in T1, T2 and T3. Histopathology examination showed tissues regeneration and decreased of polymorphonuclear cell accumulation in T1, T2 and T3 between positive groups. Optimum doses of mangosteen pericarp extract in renal recovery was found to be 400 mg/kgBW.

Keywords: *Acute Renal Failure*, streptokinase, *Garcinia mangostana*, *E-cadherin*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan berkah rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir skripsi yang berjudul **“Pengaruh Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap Ekspresi *E-cadherin* dan Histopatologi Ginjal Tikus (*Rattus novergicus*) Model *Acute Renal Failure* Hasil Induksi Streptokinase”** sebagai persyaratan mahasiswa untuk memperoleh gelar sarjana strata satu Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.

Penulis menemui kendala dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi, namun berkat motivasi, kritik, dan saran dari berbagai pihak, penulis dapat menyelesaikan tugas akhir. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

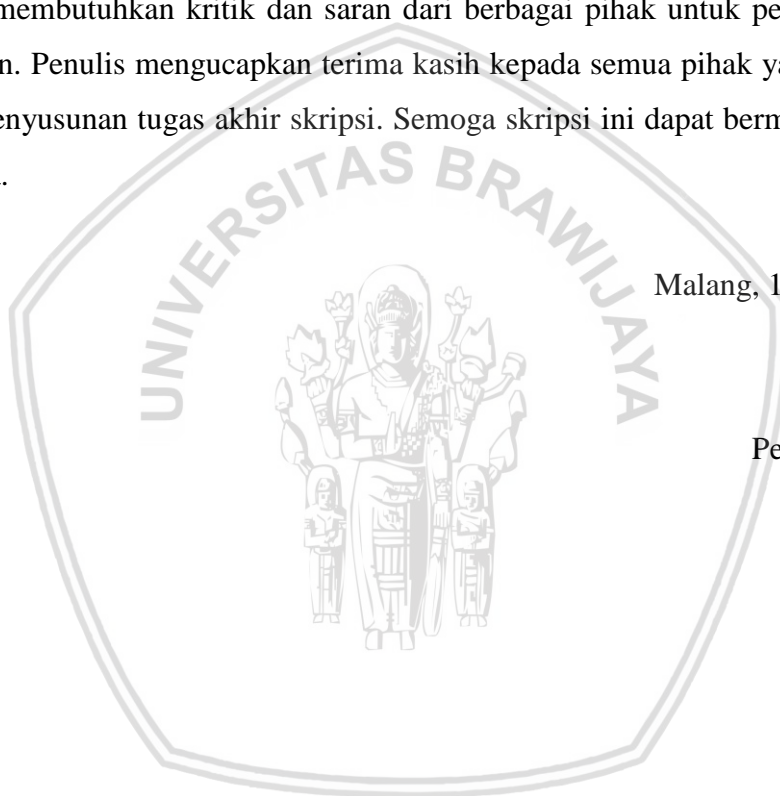
1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES sebagai dosen pembimbing pertama yang telah membimbing, memberikan arahan berupa tambahan pengetahuan dan motivasi yang diberikan kepada penulis.
2. Dyah Kinasih Wuragil S.Si., M.P., M.Sc sebagai dosen pembimbing kedua, atas nasehat, dorongan semangat, kesabaran dan pengalaman yang berharga bagi penulis.
3. drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet dan drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M.Biotech sebagai dewan penguji yang memberikan kritik dan saran untuk perbaikan penelitian dan penulisan skripsi.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang memberikan dukungan demi perkembangan FKH UB.
5. Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan Jendral Pendidikan Tinggi yang telah memberikan dana hibah pada PKM-P 2013
6. Staf Laboratorium Biosains, dan Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya yang membantu penulis dalam penelitian.
7. Wahyu Eri Setyawan., Bondan Maulana, Siti Nurhidayati dan Siti Nurjannah sebagai rekan peneliti atas kerjasama, ketekunan, kesabaran dan pengalaman yang diberikan selama penelitian.

8. Kepada keluarga yang memberikan dukungan materi, moral dan doa kepada penulis dengan penuh kasih sayang.
9. Anugrah Diky Setyawan atas motivasi, doa dan perhatian tanpa henti kepada penulis dalam setiap tahapan penyelesaian tugas akhir.
10. Seluruh kolega FKH UB atas segala dukungan, perhatian dan doa yang telah diberikan.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini belum sempurna, oleh karena itu penulis membutuhkan kritik dan saran dari berbagai pihak untuk pengembangan penelitian. Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang berperan dalam penyusunan tugas akhir skripsi. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Malang, 18 Juli 2018

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Anatomi Fisiologi Ginjal	7
2.1.1 Histologi Ginjal Normal	9
2.1.2 Kondisi Patologis Ginjal	12
2.2 <i>Acute Renal Failure</i> (ARF)	13
2.2.1 Etiologi	14
2.2.3 Patofisiologi	15
2.3 Hewan Model <i>Acute Renal Failure</i> (ARF)	17
2.3.1 Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>)	17
2.3.2 Streptokinase	19
2.4 Manggis (<i>Garcinia mangostana</i> L.)	20
2.4.1 Kandungan Senyawa Fitokimia Kulit Manggis	21
2.4.2 Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Manggis	23
2.4.3 Mekanisme Aktivitas Antioksidan terhadap <i>E-cadherin</i>	25
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	27
3.1 Kerangka Konsep	27
3.2 Hipotesis Penelitian	31
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	32
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	32
4.2 Alat dan Bahan	32
4.2.1 Alat	32
4.2.2 Bahan	32
4.3 Tahapan Penelitian	33
4.4 Prosedur Kerja	33
4.4.1 Rancangan Penelitian	33
4.4.2 Persiapan Hewan Coba	35

4.4.3	Preparasi Streptokinase	36
4.4.4	Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis	36
4.4.5	Injeksi Streptokinase pada Hewan Coba.....	37
4.4.6	Pemberian Terapi Ekstrak Kulit Manggis.....	37
4.4.7	Pembedahan Hewan Coba dan Isolasi Organ Ginjal	38
4.4.8	Pembuatan Preparat Ginjal Pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE)	38
4.4.9	Pengamatan Ekspresi <i>E-cadherin</i> dengan Imunohistokimia	40
4.4.10	Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal	41
4.4.11	Analisis Data	41
BAB 5	HASIL DAN PEMBAHASAN	42
5.1	Ekspresi <i>E-cadherin</i> Ginjal Tikus	42
5.2	Histopatologi Ginjal Tikus	48
BAB 6	KESIMPULAN DAN SARAN	54
6.1	Kesimpulan	54
6.2	Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN	65



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Xhanton dari Kulit Manggis.....	24
4.1 Rancangan Penelitian.....	33
4.2 Kelompok Perlakuan Tikus.....	34
5.1 Tabel Ekspresi <i>E-cadherin</i>	44



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Nefron	8
2.2 Histologi Kospuskulus Ginjal	10
2.3 Histologi Ginjal Pewarnaan HE	11
2.4 Histopatologi Ginjal <i>Acute Renal Failure</i>	13
2.5 Buah Manggis (<i>Garcinia mangostana</i> L.)	20
2.6 <i>Xhantones</i> pada Manggis	22
5.1 Immunohistokimia ekspresi <i>E-cadherin</i>	47
5.2 Histopatologi Ginjal Tikus Perlakuan.....	49



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	63
2. Skema Perlakuan.....	64
3. Kerangka Operasional Penelitian.....	65
4. Persiapan Larutan.....	66
5. Perhitungan Dosis Kulit Manggis.....	68
6. Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis.....	69
7. Pembuatan Preparat Histopatologi.....	70
8. Anlisis Statistika.....	74
9. Dokumentasi Kegiatan.....	77
10. Immunomembran.....	78



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/ Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
AJ	<i>Adherens Junction</i>
AKI	<i>Acute Kidney Injury</i>
ARF	<i>Acute Renal Failure</i>
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
C3	Komplemen 3
ECF	<i>Extra Cellular Fluid</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
GF	<i>Growth Factor</i>
GFR	Glomerular Filtration Rate
GGA	Gagal Ginjal Akut
HE	<i>Hematoxylen Eosin</i>
IHK	Immunohistokimia
IL	Interleukin
IU	International Unit
kDa	Kilo Dalton
KEP-UB	Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya
kg	Kilogram
LD50	<i>Lethal dose 50</i>
MD	Makula densa
mg	Miligram
mL	Mililiter
NaCl	Natrium Klorida
NO	Nitrit Oxide
NS	<i>Normal Saline</i>
PBS	<i>Phospate Buffer Saline</i>
PFA	<i>Paraformaldehida</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
RL	<i>Ringer Lactate</i>
SA-HRP	<i>Streptavidin Horseraddish Peroxidase</i>
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
UPHP	Unit Pengembangan Hewan Percobaan
V	Volume
WHO	<i>World Health Organization</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gagal ginjal akut merupakan kondisi patologis ginjal disebabkan aktivitas senyawa kimia, trauma, dan agen biologi (Kumar, 2013). Badan Kesehatan Dunia (2012) menyatakan gagal ginjal berada pada peringkat ke-10 penyakit mematikan di dunia dengan kematian mencapai 900.000 pertahun pada manusia. Berdasarkan data Perkumpulan Nefrologi Indonesia pada 2011, jumlah pasien aktif gagal ginjal mencapai 20.000 sedangkan pasien baru gagal ginjal mencapai 45.000 dan kurang dari 40% penderita yang telah menjalani pengobatan. Diantara total ± 60.000 kasus gagal ginjal terdaftar, $\pm 10\%$ didiagnosa gagal ginjal akut (ARF) sedangkan $\pm 90\%$ didiagnosa gagal ginjal kronis. Pada *pet animal*, prevalensi diestimasi sebesar 0,5-20% khususnya anjing dan kucing (Kirk, 2000; Levebre, 2011). Menurut Francey and Ariane (2008) berdasarkan data *Banfield Vet Hospital*, angka prevalensi gagal ginjal akut yaitu 1,6-8,6% setiap 1000 pasien terdaftar. Angka mortalitas *Acute Renal Failure* (ARF) tergolong tinggi sebesar 56% pada tindakan pengobatan dan 40% pada hemodialisa. Suatu studi menggunakan 100 sampel anjing dan kucing penderita gagal ginjal akut, 60% dinyatakan tidak selamat dengan rincian: 34% dieuthanasia dan 26% berkembang ke *Chronic Kidney Disease* (CKD) sedangkan kurang dari 40% dinyatakan sembuh. Hal ini menunjukkan kerusakan akut ginjal merupakan faktor yang berpengaruh terhadap resiko komplikasi (Tilley, 2011).

Pada diagnosa klinis, gagal ginjal akut diidentifikasi melalui pengukuran kadar kreatinin dan *blood urea nitrogen* (BUN) dalam serum. Indikator kreatinin

tidak dapat diandalkan karena perubahan signifikan dapat diamati pada kerusakan 50% nefron ginjal sehingga tidak merepresentasikan keadaan sebenarnya terhadap kerusakan yang bersifat progresif (Sink, 2012). Secara fisik, gejala gagal ginjal akut tidak dapat diamati melalui perubahan fisik, tingkah laku, dan volume urin oleh karena itu, dibutuhkan analisis kimia darah yang sensitif dan spesifik untuk identifikasi faktor penyebab. Keterlambatan deteksi berarti penundaan diagnosis periode awal kerusakan ginjal sehingga seringkali pada pemeriksaan pertama pada pasien langsung menunjukkan kondisi kronis yang *irreversible*. Pada kondisi akut, sel yang mengalami kerusakan berpotensi untuk regenerasi menjadi sel fungsional (*reversible*) sedangkan pada kondisi kronis, terjadi pembentukan jaringan fibrotik sehingga tidak fungsional (*irreversible*) (Chatziantoniou, 2005).

Aktivitas zat asing berupa agen infeksi dan kimiawi menstimulasi respon protektif berupa inflamasi untuk eliminasi faktor penyebab dan inisiasi regenerasi sel (Kumar *et al.*, 2013). Inflamasi fase awal ditandai migrasi neutrofil menuju daerah inflamasi oleh aktivitas TNF- α dan IL-1 sebagai sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan oleh makrofag dan neutrofil, berperan dalam aktivasi sel B dan sel T (Udani, 2009). *Reactive Oxygen Species* (ROS) secara normal diproduksi oleh sel sebagai hasil reaksi reduksi-oksidasi pada respirasi mitokondria dan pembentukan ATP sedangkan pada kondisi inflamasi, ROS dihasilkan oleh aktivitas fagositosis neutrofil dan makrofag pada saat fagositosis debris inflamasi (Tao, 2013). Sekresi ROS pada jumlah toleran menstimulasi peningkatan kemokin, molekul adhesi dan sitokin sedangkan pada akumulasi yang berlebih menyebabkan peroksidasi lipid membran, abnormalitas sitoskeletal karena penurunan *E-cadherin* sebagai protein

transmembran, dan kerusakan DNA (Kumar, 2013). Kerusakan membran plasma menyebabkan kehilangan keseimbangan osmotik fluidal dan ion, gangguan pembentukan ATP karena degradasi membran mitokondria, dan proses digesti komponen sel oleh enzim dari lisosom (protease dan glukosidase) ditandai dengan nekrosis (Kumar *et al.*, 2013). Tubuh mempunyai mekanisme regulasi radikal bebas (ROS) melalui pembentukan ikatan kovalen oleh antioksidan primer. Peningkatan jumlah radikal bebas yang tidak seimbang dengan antioksidan dalam tubuh menyebabkan stress oksidatif sehingga dibutuhkan antioksidan dari luar untuk menonaktifkan radikal bebas (Kumar, 2011).

Streptokinase merupakan *plasminogen activator* dengan berat molekul 46 kDa terdiri dari 414 asam amino yang berperan dalam induksi fibrinolisis (Ghosh, 2012). Aktivitas kerja yang luas dan tidak selektif menyebabkan degradasi fibrin pada seluruh sistem kardiovaskuler oleh aktivasi plasmin berlebihan (Hertig *et al.*, 2004). Fibrinolisis vaskuler ginjal menstimulasi respon protektif berupa inflamasi yang meningkatkan jumlah ROS. Ketidakseimbangan antara jumlah antioksidan dan radikal bebas menyebabkan kondisi stress oksidatif yang berpotensi memicu kerusakan sel (Bender, 2009; Kumar, 2013). Penggunaan streptokinase dinilai efektif pada induksi model gagal ginjal akut karena bersifat toksik, ekonomis dan lebih efisien waktu (Luqmana dkk., 2014).

Penanganan terhadap gagal ginjal akut hewan diantaranya pemberian obat penghambat sintesis prostaglandin, hemodialisa dan transplantasi ginjal, namun tindakan tersebut tergolong langka karena biaya mahal, kelangkaan obat, dan tingginya resiko komplikasi sehingga pemilik lebih memilih *euthanasia* sebagai

solusi. *Euthanasia* berkontribusi dalam peningkatan persentase mortalitas ARF karena tingkat keberhasilan upaya medis cenderung kecil (kurang dari 30% dari 100 kasus) sehingga dibutuhkan solusi alternatif yang ekonomis dan efektif dalam pencegahan dan penanganan ARF. Pada saat ini pemberian obat kimia beresiko efek samping berupa hipertensi, osteoporosis, dan kelainan hepar yang berpotensi menyebabkan kerusakan sistemik (Segev, 2011).

Khasiat tanaman herbal dipercaya turun temurun oleh rakyat Indonesia pada penanganan penyakit namun belum didukung bukti ilmiah terhadap aktivitas kandungan senyawa aktif dan uji toksisitas. Kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) diduga mengandung antiinflamasi, antibiotik, dan antioksidan (Jung *et al*, 2006; Palakawong *et al*, 2010). Kandungan aktif kulit manggis yaitu xhanton merupakan golongan flavonoid dengan komposisi terbesar yaitu α -mangostin dan γ -mangostin (Kosem *et al*. 2007; Moongkardi *et al.*, 2004). Menurut Udani *et al*. (2009), xhanton menekan aktivitas mediator inflamasi sehingga menekan produksi radikal bebas. Aktivitas sitoprotektif xhanton berpotensi menstimulasi aktivitas miRNA 192/215 yang berperan meregulasi *E-cadherin* dan amplifikasi reseptor sel terhadap *growth factor* (TGF- α , EGF, PDGF, dan VEGF) pada regenerasi jaringan pasca inflamasi akut (Wang, 2010; Kumar *et al.*, 2013).

Penelitian mengenai aktivitas kandungan kulit manggis merupakan upaya pemanfaatan limbah yang berpotensi sebagai kandidat obat. Pemanfaatan kulit manggis (*Garcinia mangostana*) membutuhkan dukungan ilmiah penelitian lebih lanjut sehingga dapat diintegrasikan dalam sistem pelayanan kesehatan sebagai tindakan pencegahan dan penanganan gagal ginjal akut, oleh karena itu penelitian

tentang pengaruh ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap ekspresi *E-cadherin* dan gambaran histopatologi ginjal tikus (*Rattus novergicus*) model *Acute Renal Failure* (ARF) hasil induksi streptokinase, penting dipelajari untuk memberikan gambaran patomekanisme gagal ginjal akut yang dapat digunakan dalam pengembangan penelitian lebih lanjut terhadap terapi alternatif dan deteksi dini gagal ginjal akut.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- 1) Apakah pemberian terapi ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) berpengaruh terhadap ekspresi *E-cadherin* ginjal tikus (*Rattus novergicus*) model *Acute Renal Failure* hasil induksi streptokinase?
- 2) Bagaimana pengaruh terapi ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap histopatologi ginjal tikus (*Rattus novergicus*) model *Acute Renal Failure* hasil induksi streptokinase?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, penelitian ini dibatasi pada:

- 1) Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar jantan berumur 10-12 minggu dan berat badan 150-200 gram yang didapatkan dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian ini telah mendapat persetujuan Komisi Etik Universitas Brawijaya Malang dengan No.233-KEP-UB.
- 2) Pembuatan hewan model dilakukan dengan injeksi streptokinase dosis 6000 IU/ekor intravena sebanyak tiga kali dengan interval lima hari.

- 3) Buah manggis berasal dari wilayah Malang dan telah diidentifikasi di Laboratorium Taksonomi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam berdasarkan surat keterangan No.0131/Takso.identifikasi/03/2014.
- 4) Pemberian ekstrak kulit manggis dengan dosis 200 mg/KgBB (T1), 400 mg/KgBB (T2), dan 600 mg/KgBB (T3) sebanyak 2 mL/ekor/hari selama 14 hari menggunakan metode *force feeding* (Mansour, 2013).
- 5) Variabel yang diamati pada penelitian adalah ekspresi *E-Cadherin* dengan aplikasi *Immunomembran* dan pengamatan histopatologi ginjal pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE).

1.4 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian adalah sebagai berikut:

- 1) Mengetahui pengaruh terapi ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap ekspresi *E-Cadherin* pada ginjal tikus (*Rattus novergicus*) model *Acute Renal Failure* (ARF) hasil induksi streptokinase.
- 2) Mengetahui pengaruh terapi ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap gambaran histopatologi ginjal tikus (*Rattus novergicus*) model *Acute Renal Failure* (ARF) hasil induksi streptokinase.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai aktivitas senyawa aktif ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) sebagai antiinflamasi, antibiotik, sitoprotektif dan antioksidan yang dapat dikembangkan untuk solusi alternatif penanganan *Acute Renal Failure* (ARF) dan mendukung perkembangan penelitian herbal melalui eksplorasi flora di Indonesia.

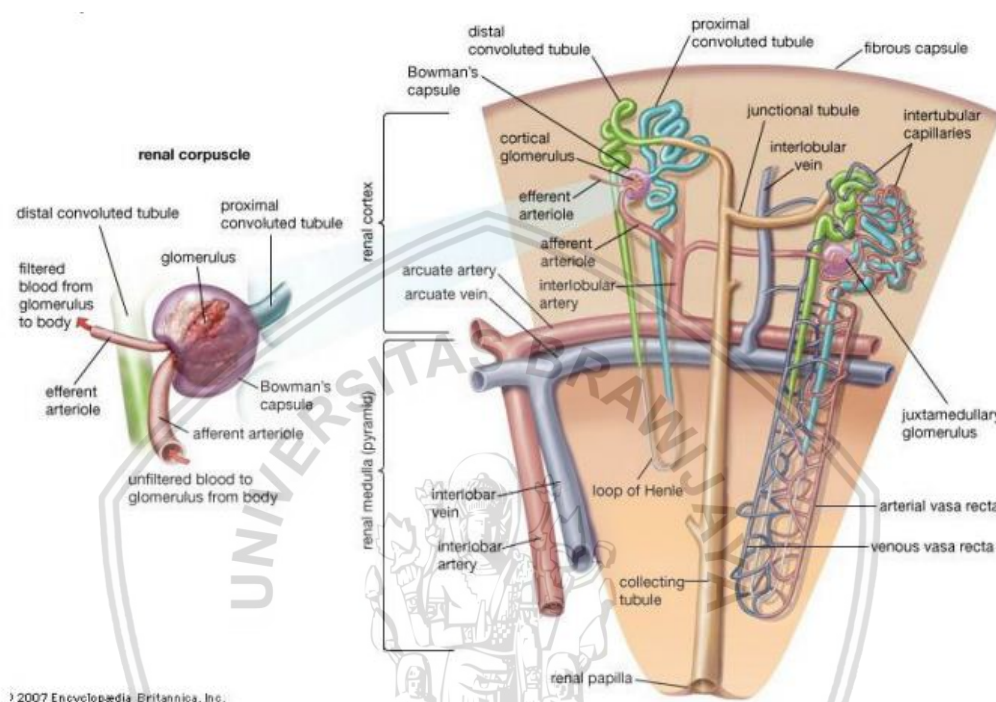
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anatomi Fisiologi Ginjal

Ginjal merupakan organ berbentuk seperti biji kacang terletak di kanan dan kiri columna vertebralis. Menurut Treuting dan Dintzis (2012), struktur ginjal menciit yaitu retroperitoneal, bilateral dan unilobar pada cranial mid-abdomen. Setiap ginjal terdiri dari lebih dari empat juta nefron dengan struktur dan fungsi yang sama (Price dan Wilson, 2012). Unit fungsional ginjal terdiri korpuskulus renalis berupa anyaman kapiler arteriola afferen yang dibungkus oleh kapsul fibrosa keras sebagai lokasi filtrasi dan tubulus renalis sebagai lokasi reabsorbsi dan sekresi yang terdiri tubulus kontortus proksimal, tubulus kontortus distal dan tubulus kolektivus (Junquiera, 2013). Aliran darah ginjal berasal dari arteri renalis melewati *hilum* sebagai tempat masuknya arteri dan vena renalis yang bercabang membentuk arteri interlobular, arteri arcuata, arteri interlobularis dan arteriola afferen penyusun kapiler glomerulus, sedangkan sistem vena berjalan paralel dengan sistem arteriol membentuk vena interlobular, vena arkuata dan vena renalis (Guyton dan Hall, 2008).

Sistem ekskresi berkontribusi dalam pemeliharaan homeostasis melibatkan proses filtrasi, absorpsi aktif, absorpsi pasif dan sekresi (Tortora dan Derickson, 2012). Ginjal sebagai organ ekskresi berperan dalam regulasi osmolaritas plasma darah, ekskresi produk sisa metabolisme, ekskresi senyawa asing, pengaturan *Extra Celullar Fluid* (ECF) dan pemeliharaan keseimbangan asam basa. Fungsi non-ekskresi ginjal meliputi sintesis dan aktivasi hormon diantaranya sekresi renin

yang terlibat dalam regulasi tekanan darah, produksi *erythropoietin* yang merupakan glikoprotein sebagai faktor stimulan produksi eritrosit, dan sekresi prostaglandin yang berperan sebagai vasodilatator (Junquiera, 2013).



Gambar 2.1 Struktur Nefron
(Focosi, 2009)

Produk metabolisme protein yang diekskresi melalui urin berupa urea (dari sisa metabolisme asam amino), asam urat (dari asam nukleat), dan kreatinin (Cr) (Guyton dan Hall, 2008). Proses dasar pembentukan urin meliputi pembentukan filtrat glomerulus, sekresi dan reabsorpsi tubulus. Proses filtrasi merupakan proses penyaringan darah melalui anyaman pembuluh kapiler glomerulus membentuk filtrat glomeruli bebas protein. Filtrat glomeruli kemudian dialirkan ke tubulus ginjal untuk reabsorpsi melewati *brush border* pada tubulus renalis dan diangkut kapiler peritubular ke pembuluh vena untuk ditransportasikan kembali. Proses

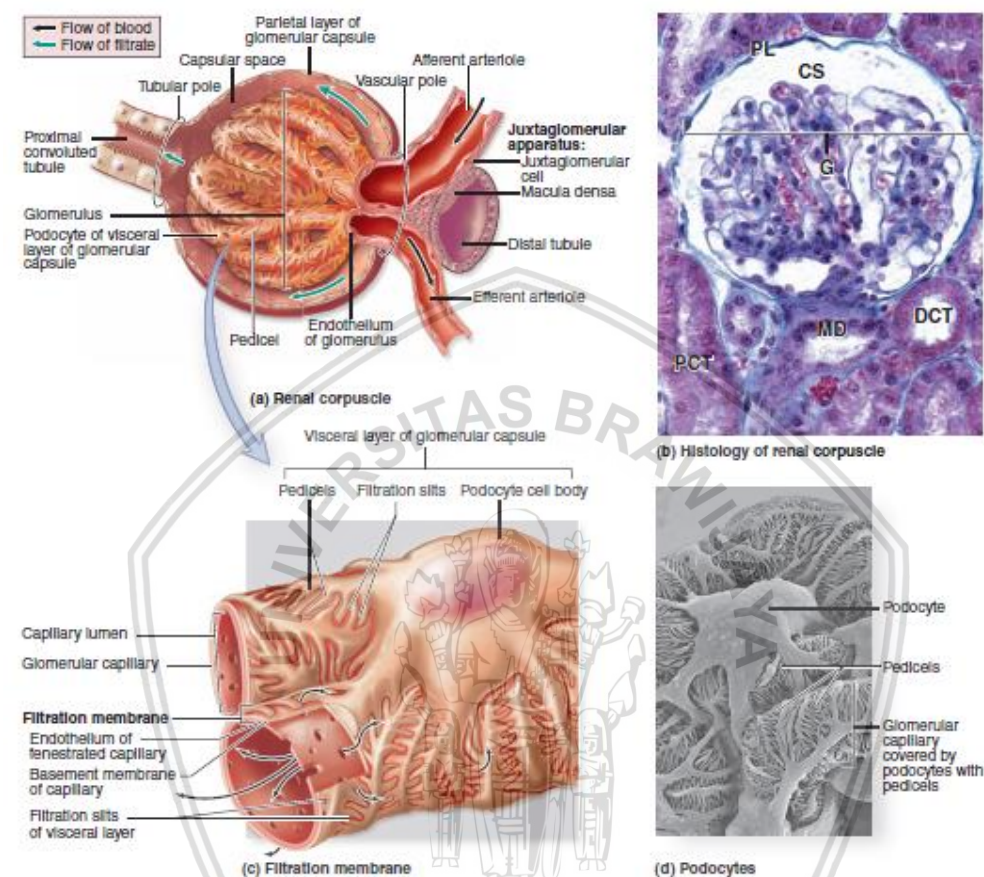
selanjutnya adalah sekresi tubulus yang merupakan perpindahan selektif zat dari kapiler peritubulus ke lumen tubulus untuk diekskresi (Junquiera, 2013).

2.1.1 Histologi Ginjal Normal

Ginjal normal terdiri dari bagian luar (*cortex*) dan bagian dalam (*medulla*) (Dellmann dan Eurell, 2006). Korteks terdiri dari pars konvoluta dan pars radiata dimana pars konvoluta terdiri dari korpuskulus ginjal dan tubulus proksimal yang membentuk labirin kortikal pada zona luar (*outer zone*) dan sementara pars radiata tersusun dari segmen lurus berbentuk tubulus memanjang pada zona dalam (*inner zone*) (Junquiera, 2013). Ginjal dibungkus oleh tiga lapis jaringan yaitu kapsula renalis sebagai lapisan terdalam, jaringan adiposa dan fascia renal yaitu jaringan terluar (Tortora dan Derrickson, 2008). Menurut Saldarriaga dkk. (2008), struktur histologi permukaan ginjal terdiri dari jaringan ikat fibrosa dan kapsula adiposa.

Unit fungsional ginjal disebut nefron terdiri dari badan malpighi (*Renal corpuscle*), tubulus kontortus proksimal (*Proximal convoluted tubule*), lengkung henle (*Loop of Henle*), tubulus disatal (*Distal convoluted tubule*) dan duktus kolektifus (*Collecting duct*) (Junqueira, 2013). Berdasarkan hasil potongan melintang ditunjukkan diameter korpuskulus ginjal adalah 200-250 μm terdiri dari anyaman kapiler yang dilapisi sel endotel dan dikelilingi oleh kapsula epitel ganda berbentuk seperti mangkok disebut kapsula Bowman (Treuting and Dinzie, 2012). Kapsula Bowman dan glomerulus bergabung membentuk badan malpighi. Lapisan terluar atau *parietal layer* tersusun dari epitel pipih selapis sedangkan lapisan dalam atau *visceral layer* tersusun dari sel modifikasi yang berinteraksi dengan membran basalis disebut *podocyte* (Gartner dan Hiatt, 2007). *Podocyte*

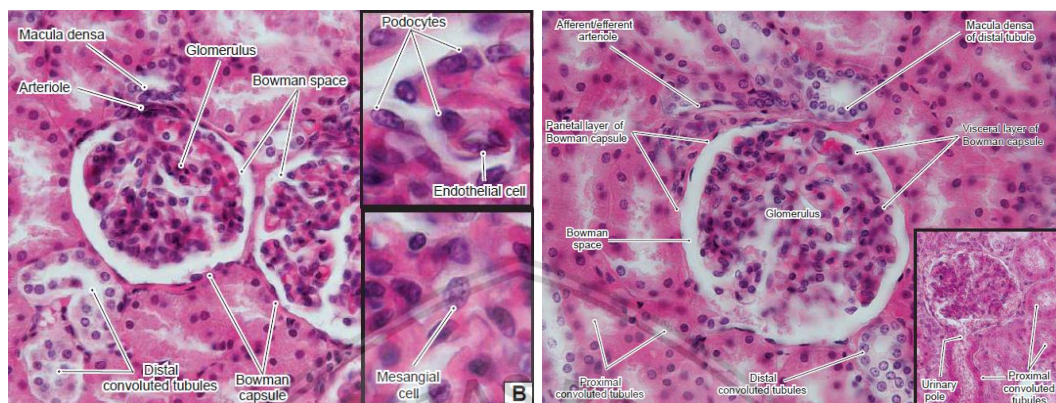
membungkus bagian glomerulus membentuk struktur dengan badan sel besar yang dipenuhi tonjolan sitoplasma (Junqueira, 2013).



Gambar 2.2 Histologi Korpuskulus Ginjal
(Junqueira, 2013)

Diantara lapisan visceral dan parietal terdapat ruangan disebut Bowman's *space* sebagai penampung filtrat sebelum dialirkan ke tubulus proksimal (Price and Wilson, 2012). Setiap korpuskulus renalis terdiri dari dua kutub yaitu kutub vaskuler sebagai tempat masuknya arteriol afferen dan keluarnya arteriol efferen serta kutub urinarius sebagai tempat reabsorpsi pada tubulus kontortus proksimal (Junqueira, 2013). Pada kutub vaskuler terdapat sekelompok sel sensori khusus yaitu aparatus juxtaglomerular yang meregulasi tekanan darah dan pelepasan renin

yang tersusun dari sel granular, makula densa dan sel mesangial ekstrasglomerular (Junqueira, 2013).



Gambar 2.3 Histologi Ginjal Pewarnaan HE
(Cui, 2011)

Kutub urinarius merupakan bagian awal tubulus kontortus proksimal yang disusun epitel kuboid selapis yang asidofilik karena ukuran mitokondria yang memanjang dengan struktur mikrovili membentuk *brush border* (Verma, 2001). Tubulus kontortus proksimal terdiri dari pars konvoluta yang berbatasan kospuskula ginjal dan pars rekta yang berjalan ke medula dan berdiferensiasi menjadi lengkung henle (*Henle's Loop*) yang terdiri dari *descending thick segment*, *descending thin segment*, *ascending thin segment*, dan *ascending thick segment* (Junquiera, 2013). Ruas Henle menembus korteks dan menjadi saluran berkelok disebut tubulus kontortus distal. Sel epitel pada tubulus kontortus distal peka terhadap toksin karena permukaan reabsorpsi yang luas dan aktivitas transpor aktif ion dengan laju yang tinggi. Setiap tubulus distal mempunyai kontak dengan kutub vaskuler pada nefron yang sama sehingga mengalami modifikasi membentuk *macula densa* yang terdiri dari sel epitel kolumnar.

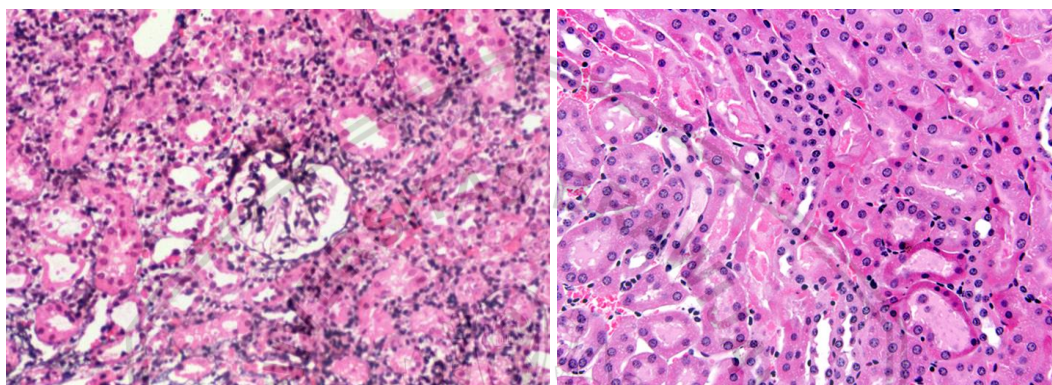
Jaringan otot polos yang berinteraksi dengan *macula densa* akan termodifikasi membentuk sel granula juxtaglomerulus (Junqueira, 2013).

Bagian medula terdiri dari struktur piramid disebut *medullary pyramid* dilengkapi jaringan ikat berupa *columns of Bertin*, tersusun dari 500 *medullary rays* terdiri dari duktus kolektivus yang lurus. Pada bagian medula terdapat lengkung Henle, tubulus kontortus distal, dan tubulus kolektivus. Beberapa tubulus kontortus bermuara pada satu duktus kolektivus yang mempunyai epitel kolumnar selapis. Duktus kolektivus menuju kesaluran lebih besar yang terletak diujung piramid (duktus Bellini) yang berakhir pada *minor calyx* (Junqueira, 2013).

2.1.2 Kondisi Patologis Ginjal

Ginjal merupakan organ vital karena 25% curah jantung darah mengalir menuju ginjal dan beresiko tinggi terjadi kontak zat toksik dalam jumlah besar (Rosenfeld, 2010). Senyawa toksik dapat menyebabkan insufisiensi ginjal karena akumulasi konsentrasi dalam darah (Price dan Wilson, 2012). Kerusakan nefron disebabkan trombosis, emboli, trauma dan infeksi ditandai terjadinya infiltrasi neutrofil (Cho, 2010; Boor, 2011). Degenerasi adalah hilangnya struktur normal sel akibat pengaruh dalam atau luar sel yang ditandai gangguan metabolik seluler yang merusak struktur sel penyusun jaringan glomerulus sehingga proses filtrasi terganggu dan berpotensi berdampak pada degradasi tubulus kontortus proksimal dan kontortus distal karena banyaknya jumlah molekul dan tingginya laju reabsorpsi (Rosenfeld, 2010). Berdasarkan studi histopatologi *Acute Renal Failure* (ARF) yang ditandai dengan glomerulonefritis akut, ditunjukkan adanya

ekstravasasi neutrofil, akumulasi sel radang interstisial, degradasi membran basalis, pelepasan jaringan epitel dari membran basal (*epithelial detachment*), lepasnya sel ginjal kearah lumen (*sloughing*), vakuolisasi sel, ruptur vaskuler, pembengkakan sel (*cloudy swelling*) dan pembentukan jaringan nekrotik (Kumar, 2013; Wati *et al.*, 2013).



Gambar 2.4 Histopatologi ginjal *Acute Renal Failure* (Luo,2009)

2.2 Acute Renal Failure (ARF)

Acute Renal Failure (ARF) merupakan kondisi kelainan fungsi ginjal dalam regulasi keseimbangan cairan dan mineral darah yang menyebabkan reaksi inflamasi (Aru, 2007). Resiko terjadinya gangguan ginjal mengalami peningkatan seiring dengan pertambahan umur hewan. Diagnosa gagal ginjal akut dideteksi melalui peningkatan kadar kreatinin serum darah dan kegagalan ekskresi nitrogen. Pada *pet animal*, perubahan fisik hewan dan tingkah laku ditunjukkan apabila kerusakan nefron ginjal telah mencapai 65-70% oleh karena itu seringkali baru teridentifikasi saat status penyakit memasuki tahap kronis (Elliot, 2007).

Menurut Sinto (2010), ARF dikategorikan empat tahapan yaitu tahapan inisiasi merupakan fase tersingkat berupa reaksi tubuh terhadap agen penyebab.

Pada tahapan ini tanda klinis tidak terlihat dan tidak dapat disimpulkan melalui uji kimia darah karena cenderung tidak stabil. Tahapan kedua adalah fase ekstensi yaitu ginjal menunjukkan gejala *ischemia*. Pada tahap ketiga yaitu *maintenance phase*, ginjal melakukan otoregulasi mempertahankan tekanan darah melalui peningkatan GFR namun dalam jangka waktu tertentu, ginjal akan mengalami penurunan fungsi secara bertahap dalam hitungan hari hingga minggu. Tahapan keempat merupakan tahap penyembuhan yang tidak selalu terjadi pada semua individu tergantung pada imunitas dan aktivitas *growth factor* yang diinduksi oleh aktivitas platelet diantaranya *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor alfa* (TGF- α), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *epidermal growth factor* (EGF) dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF) yang berperan dalam proliferasi dan diferensiasi sel yang terdegradasi pasca inflamasi (Segev, 2011; Hammerman *et al.*, 2000). Pada tahapan tertentu, ARF bersifat *reversible* sehingga jaringan dapat terdiferensiasi mendekati kondisi normal yang fungsional sedangkan pada tahapan lanjutan berpotensi berkembang menjadi CKD yang *irreversible* dan tidak fungsional (Francey, 2008).

2.2.1 Etiologi

Menurut Sulyok (2004), faktor penyebab *Acute Renal Failure* diantaranya infeksi mikroorganisme (*Streptococcus* sp., *Leptospira* sp), sindrom hemolitik, obstruksi, trauma, dehidrasi, *ischemia*, akumulasi zat kimia (*ethylene glycol*, *amynoglycosides*, *ibuprofen*, *thiacetarsamide* dan *amphotericin B*), tingginya konsentrasi mineral darah (kalsium, potassium dan natrium), dan logam berat. Berdasarkan lokasi patogenesis, ARF dibagi menjadi faktor prerenal (gangguan

vaskuler ke ginjal) akibat hipovolemia, hipoperfusi ginjal, penyakit renovaskuler, nefrosklerosis intrarenal, dan gangguan respon autoregulasi ginjal; faktor renal (kerusakan internal ginjal) akibat nefrotoksin, glomerulonefritis, nekrosis tubular, obstruksi renovaskuler, dan nefritis interstisial; serta faktor postrenal (aliran urin dari ginjal terganggu oleh obstruksi) akibat uterelal kalkulus, kanker, dan hipertrofi prostat (Pardede, 2009).

2.2.2 Patofisiologi

Gambaran umum gagal ginjal akut diperoleh melalui hubungan laju filtrasi glomerulus terhadap kadar kreatinin (Cr) serum dan *blood urea nitrogen* (BUN) sebagai penentu derajat kerusakan nefron. Gagal ginjal akut dibagi stadium ringan dan berat dimana pada stadium ringan kreatinin serum dan kadar BUN tergolong normal sedangkan pada stadium berat terjadi insufisiensi ginjal akibat kerusakan jaringan yang mencapai 75% sehingga terjadi peningkatan signifikan persentase kadar BUN dan kreatinin (Susanto, 2014). Hilangnya 75% nefron berdampak pada tingginya kecepatan filtrasi dan beban zat terlarut pada nefron yang tersisa sehingga tidak tercapai keseimbangan filtrasi dan reabsorpsi pada proses ekskresi. Kadar normal kreatinin dan ureum darah pada tikus putih jantan adalah 0,20-0,80 mg/dl dan 15,00- 21,00 mg/dl (Lakshmi, 2014).

Pada ARF/AKI prerenal terjadi hipoperfusi ginjal akibat turunnya curah jantung sehingga mengaktifasi renin-angiotensin yang merangsang pelepasan vasopresin dan endothelin-1. Pada keadaan ini ginjal melakukan otoregulasi untuk mempertahankan laju filtrasi glomerulus (Sinto, 2010). Reabsorpsi natrium dan air mengalami peningkatan untuk mempertahankan tekanan darah sehingga terjadi

oliguria bahkan anuria. Apabila faktor prerenal dapat diatasi, fungsi ginjal dapat normal kembali namun apabila hipovolemia berlangsung lama dapat terjadi kerusakan parenkim ginjal (Bijanti, 2010).

Pada ARF/AKI renal terjadi abnormalitas vaskuler oleh beberapa faktor penyebab inflamasi. Peningkatan TNF- α dan interleukin-18 (IL-18) memacu ekspresi molekul adhesi berupa selektin dan ligan untuk integrin leukosit sebagai mediator inflamasi akut sehingga terjadi vasokonstriksi intrarenal dan penurunan *Glomerular Filtration Rate*. Kerusakan sel endotel vaskular ginjal mengakibatkan peningkatan angiotensin II, ET-1 dan ROS yang berperan dalam nekrosis sel (Kumar, 2013).

ARF/AKI post renal disebabkan oleh faktor prerenal dan renal, dimana terjadi peningkatan level marker fibrosis diantaranya TGF- β yang menginduksi nekrosis sel dan pembentukan jaringan fibrotik (Trihono, 2011). Ekspresi TGF- β pada tubulointerstisial ginjal berkorelasi dengan derajat inflamasi (Abbas, 2015).

Tahapan ARF diawali dengan kerusakan endotelium yang menginduksi vasodilatasi pembuluh kapiler sehingga terjadi ekstrasvasasi neutrofil, makrofag dan sel dendritik pada daerah inflamasi (Pardede, 2009). Aktivitas fagositosis dan sitokin proinflamasi TNF- α , IL-1 β , IL-6 dan IL-8 menghasilkan produk berupa ROS sehingga terjadi peningkatan ROS (Kumar, 2013). Sekresi ROS pada jumlah toleran menstimulasi peningkatan kemokin, molekul adhesi dan sitokin sedangkan pada akumulasi berlebihan akan berikatan dengan asam lemak fosfolipida yang menyebabkan peroksidasi lipid membran, gangguan transport molekul, penurunan

sintesis *E-cadherin* sebagai protein transmembran oleh miRNA 192/215, dan kerusakan metabolisme sel yang berdampak kematian sel (Kumar, 2013).

Aktivitas leukosit memicu kerusakan jaringan saat diaktivasi mediator inflamasi, namun apabila dimodulasi oleh mediator lipid, leukosit dapat menjadi mediator perbaikan jaringan diperantarai *growth factor* (TGF- α , EGF, PDGF, dan VEGF) (Boor, 2011). Aktivitas mediator lipid berperan dalam peningkatan IL-10 dan penghambatan aktivitas sitokin inflamasi TNF- α , IL-1 β , IL-6 dan IL-8 pada jaringan ginjal. Resolvin dan protektin yang diperantarai oleh sitokrom P450 berperan menurunkan massa sel radang dan menstimulasi keluarnya makrofag dari jaringan inflamasi melalui pembuluh limfatik (Ariel, 2007).

2.3 Hewan Model *Acute Renal Failure* (ARF)

2.3.1 Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Tikus putih (*Rattus novergicus*) digunakan sebagai hewan model pada penelitian karena kemampuan reproduksi tinggi, mudah diperoleh, harga relatif murah dan sistem fisiologis yang mirip *pet animal* mamalia (Sihombing, 2011; Miller *et al.*, 2010). Tikus putih strain Wistar mempunyai ciri fisik kepala lebar, telinga panjang, dan ekor lebih pendek dari tubuhnya (Kusumawati, 2004). Hewan model dengan tikus putih digunakan pada penelitian *kidney disease*, diabetes melitus, dan *hypercholesterolemia* (Ponticelli, 2000). Penggunaan tikus putih jantan dikarenakan kondisi biologisnya lebih stabil dibandingkan betina tanpa dipengaruhi siklus estrus. Hewan coba yang digunakan mempunyai keseragaman berat badan, jenis kelamin dan umur untuk memperkecil variasi respon biologis sehingga memberikan respon relatif seragam (Suckow, 2006).

Menurut Armitage (2004), tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Class	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Sub Ordo	: Sciurognathi
Familia	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Galur	: Wistar

Pada pemeliharaan hewan coba, dibutuhkan komposisi makanan meliputi: protein 20-25 %, lemak kasar 3-5%, serat kasar 8%, kalsium 0,8-1%, karbohidrat 45-50%, vitamin A, vitamin D, alfa tokoferol, asam linoleat, thiamin, riboflavin, panthothenat, biotin, serta mineral, fosfor, magnesium, potasium, iodin dan zat besi (AOAC, 2005). Lokasi pemeliharaan terhindar dari polusi untuk mencegah stress. Hewan model diberikan pakan 15-20 gram perekor dengan pemberian air minum adlibitum.

Pembuatan hewan model gagal ginjal ginjal pada penelitian sebelumnya menggunakan tikus putih jantan hasil induksi *Cyclosporin-A* (Slattery, 2005; Ponticelli, 2000). Menurut Wati dkk. (2013), pembuatan hewan model gangguan ginjal dengan *Cyclosporine-A* dibutuhkan waktu 28 hari sedangkan penggunaan streptokinase dibutuhkan waktu 14 hari.

2.3.2 Streptokinase

Streptokinase merupakan protein ekstraseluler yang diproduksi oleh strain *Streptococcus β -haemolytic* dengan berat molekul 46 kDa, terdiri dari 414 asam amino (Ghosh, 2012). Streptokinase merupakan *plasminogen activator* karena kemampuannya mengaktivasi plasminogen menjadi plasmin dan dikenal sebagai agen trombolitik sebagai terapi pada kasus penyumbatan pembuluh darah (Sulyok, 2004; (Tjay, 2007). Aktivitas plasmin menyebabkan pemecahan protein matriks ekstraseluler, degradasi fibrin dan induksi pelepasan vasoaktif bradikinin yang mengaktivasi bradikinin sebagai initiator mediator inflamasi melalui pelepasan sitokin (Böckman and Paegelow, 2000).

Aktivitas kerja yang luas dan tidak selektif menyebabkan degradasi fibrin pada seluruh sistem kardiovaskuler oleh aktivasi plasmin berlebihan (Hertig *et al.*, 2004). Kerusakan endothelium meningkatkan aktivitas molekul adhesi berupa selektin dan ligan untuk $\beta 2$ integrin yang berperan pada opsonisasi neutrofil dan makrofag (Liu, 2006). Fibrinolisis menstimulasi respon protektif berupa inflamasi yang meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Ketidakseimbangan antara jumlah antioksidan dan radikal bebas disebut kondisi stress oksidatif yang berpotensi terjadinya pemecahan lipid membran sel, gangguan sistesis protein, gangguan metabolisme sel dan induksi kematian sel (Bender, 2009; Kumar, 2013).

Streptokinase dinilai efektif pada induksi model gagal ginjal akut karena bersifat toksik, ekonomis dan lebih efisien waktu (Luqmana dkk., 2014). Hasil induksi streptokinase 6000 IU pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) menurut

penelitian Wati dkk. (2013), terjadi nefritis, nekrosis dan pembentukan jaringan fibrotik sehingga dijadikan alternatif pembuatan hewan model gagal ginjal akut yang lebih efektif dan ekonomis dibandingkan *Cyclosporin-A*. Penentuan dosis injeksi streptokinase diperhitungkan apabila ada kemungkinan antibodi terhadap streptokinase akibat infeksi *streptococcus*, sehingga dosis yang diinjeksikan harus mampu mengatasi resistensi (Ghosh, 2012).

2.4 Manggis (*Garcinia mangostana*)

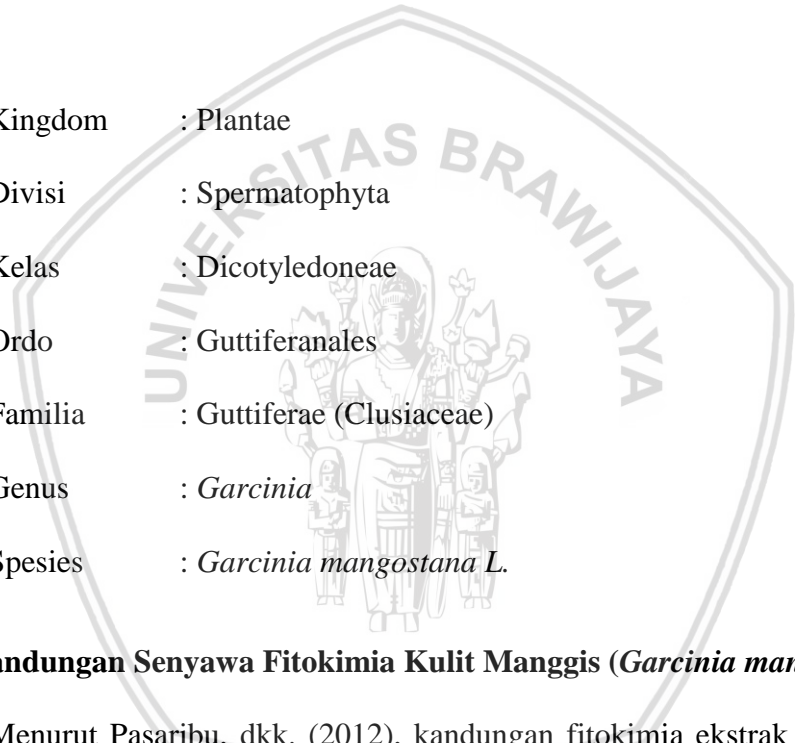
Manggis (*Garcinia mangostana*) merupakan tanaman tropis yang tersebar di wilayah Asia Tenggara hingga Amerika Tengah (ICUC, 2003). Tanaman manggis memiliki adaptasi luas terhadap jenis tanah dengan tekstur liat berpasir. Pohon manggis tumbuh di ketinggian 0-600 m di atas permukaan laut, derajat keasaman tanah 5-7, suhu udara 20-30°C, dan curah hujan 1270-2500 mm/tahun dengan kelembaban udara sekitar 80% dan intensitas cahaya matahari optimum (Mardiana, 2012).



Gambar 2.5 Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.)
(Nugroho, 2009)

Buah manggis berdiameter 4-7 cm dengan dinding buah tebal berwarna ungu tua (Widiastuti, 2010). Kandungan kulit buah manggis adalah tanin dan

xanthone sehingga kulit buah manggis berwarna kecoklatan, kemerahan dan keunguan. Menurut Dewi dkk. (2013), komposisi kulit buah manggis terdiri dari serat kasar 29%, tannin 1,1% dan zat terlarut dalam isoheksana 4,5%. . Tanin merupakan senyawa turunan polifen sebagai antibiotik dapat larut dengan pelarut polar sampai semipolar (Nganlasom *et al.*, 2008; Obolskiy *et al.*, 2009). Menurut Osman (2006), kedudukan manggis dalam taksonomi diklasifikasikan sebagai berikut :

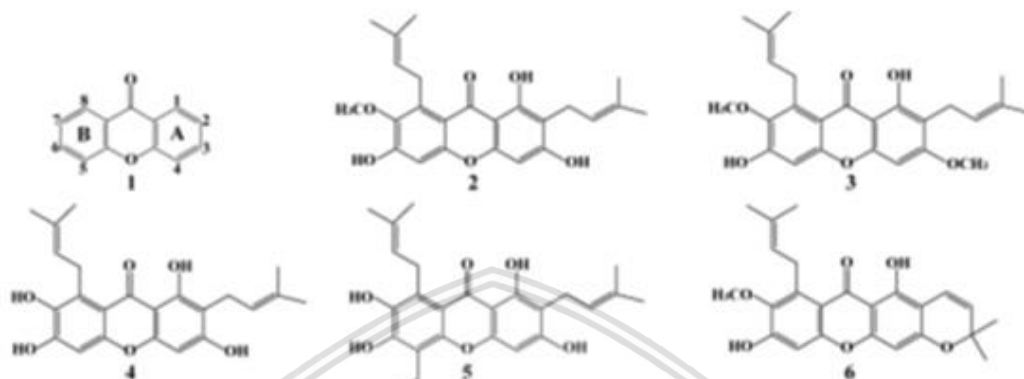


Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Guttiferanales
Familia	: Guttiferae (Clusiaceae)
Genus	: <i>Garcinia</i>
Spesies	: <i>Garcinia mangostana</i> L.

2.4.1 Kandungan Senyawa Fitokimia Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*)

Menurut Pasaribu, dkk. (2012), kandungan fitokimia ekstrak etanol 96% kulit manggis berupa golongan alkaloida, saponin, tanin, glikosida, flavonoid dan triterpenoid. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Masniari dan Praptiwi (2010), menunjukkan ekstraksi kulit manggis dengan etanol 70% mengandung komponen alkaloid, saponin, tanin, steroid, dan fenolik. Senyawa fenolik berpotensi sebagai antioksidan dan *scavenger* radikal bebas (Chitchumroonchokchai, 2012). Senyawa saponin merupakan glikosida alami sebagai agen hipoglikemik berperan dalam keseimbangan hormonal. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang paling

banyak terkandung dalam kulit manggis, berperan aktif terhadap respon inflamasi, mikroorganisme dan radikal bebas (Ngawhirunpat *et al.*, 2010).



Gambar 2.6 Xanthones. (1) inti xanthone; (2) α -mangostin; (3) β -mangostin; (4) γ -mangostin; (5) garcinone E; (6) 9-hydroxycalabaxanthone (Nugroho, 2009)

Kulit buah manggis memiliki sifat antioksidan yang dikaitkan dengan adanya bahan aktif berupa *xanthones* (*9H-xanthen-9-one* *benzo- γ -pirone 1*) berupa substansi kimia alami golongan *polyphenolic* (Ho *et al.*, 2002). *Xhantone* terkandung pada seluruh bagian tumbuhan manggis dengan komposisi terbesar pada kulit manggis. Kandungan xhanton kulit manggis (*Garcinia mangostana*) berperan sebagai senyawa antioksidan (Jung *et al.* 2006; Kosem *et al.*, 2007; Ngawhirunpat *et al.*, 2010), antiinflamasi (Chomnawang *et al.*, 2007; Tewtrakul S *et al.*, 2009), antikanker (Akao *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2010), neuroprotektif (Weecharansan *et al.*, 2006), anti-acne (Pothitirat *et al.*, 2010), antiproliferasi (Matsumoto *et al.*, 2003) dan sitoprotektif (Palakawong *et al.*, 2010). Xanthon menghambat produksi *pro-inflammatory cytokines* pada mekanisme inflamasi (Kumar, 2013). Menurut Obolskiy *et al.* (2009), xanthon merupakan kelas utama fenolik dalam tanaman.

Tabel 2.1 Xhanton dari Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L.)
(Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008)

No	Nama Senyawa
1	α -Mangostin
2	β -Mangostin
3	γ -Mangostin
4	Mangostanol
5	Mangostenol
6	1-Isomangostin
7	1-Isomangostin hydrate
8	3-Isomangostin
9	3-Isomangostin hydrate
10	1,6-Dihydroxy-7-methoxy-8-isoprenyl-60,60-dimethylpyrano(20,30:3,2)xanthone
11	Toxyloxanthone A (trapezifolixanthone)
12	Calabaxanthone
13	Demethylcalabaxanthone
14	Caloxanthone A
15	Macluraxanthone
16	1,7-dihydroxyxanthone)
17	Euxanthone
18	Cudraxanthone
19	8-hydroxycudraxanthone G
20	Esmeatxanthone A
21	BR-xanthone A
22	BR-xanthone B
23	Mangostanin
24	Mangostenone A
25	Mangostenone B
26	Mangostinone Asai
27	Gartanin
28	8-Deoxygartanin
29	Garcinone A
30	Garcinone B
31	Garcinone C
32	Garcinone D
33	Garcinone E
34	Garcimangosone A
35	Garcimangosone B
36	Garcimangosone C
37	Garcimangosone D
38	Tovophyllin A
39	Tovophyllin B

2.4.2 Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Manggis

Uji toksisitas dibagi menjadi tiga kelompok yaitu uji toksisitas akut yang dilakukan selama 7-14 hari, uji toksisitas subkronik yaitu pengujian dengan pemberian bahan berulang setiap hari selama 10% dari masa hidup hewan sekitar

3 bulan pada tikus, dan uji toksisitas jangka panjang (kronik) yaitu percobaan pemberian obat secara berulang selama 24 bulan (Winarno, 2010). Berdasarkan keseluruhan uji toksisitas, ekstrak kulit manggis tidak menunjukkan efek toksik secara akut maupun subkronis. Menurut Pongphasuk (2005), LD50 atau dosis yang menyebabkan kematian pada 50% hewan coba ekstrak kulit manggis sebesar 9370 mg/kgBB pada mencit dan pemberian *α-mangostin* peroral hingga 10.000 mg/kgBB tidak menyebabkan kematian pada 24 jam. Penelitian toksisitas ekstrak 95% ethanol kulit buah manggis pada tikus Sprague-Dawley pada dosis 50, 500 dan 1000 mg/kgBB selama 28 hari tidak menunjukkan mortalitas maupun tanda kelainan klinis dan parameter biokimia pada paru, jantung, hati, limfa, ginjal, testis dan ovarium (Jujun *et al.* 2008). Uji toksisitas lainnya dilakukan pada tikus Swiss albino menggunakan ekstrak hydroethanol kulit buah manggis dosis 2 gram dan 5 gram/kg BB tidak menunjukkan toksisitas selama 14 hari pengamatan. Pada uji toksisitas subkronis tikus Wistar, ekstrak kulit buah manggis dosis 400, 600 dan 1200 mg/kg BB selama 12 minggu tidak menyebabkan perubahan perilaku, pola makan dan minum, pertumbuhan, status kesehatan dan tanda abnormalitas histopatologi organ internal namun berdasarkan parameter biokimia terdapat peningkatan *direct bilirubin* sebagai pertanda hepatitis akut (Hutadilok *et al.*, 2010). Menurut penelitian Chivapat *et al.* pada tahun 2011, pemberian ekstrak etanol kulit manggis dengan 20, 100, 500, dan 1000 mg/kgBB/hari selama 24 minggu tidak menunjukkan farmakotoksik. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak kulit manggis tergolong aman dikonsumsi pada dosis dibawah 1000 mg/kg BB tanpa efek samping yang beresiko terjadi komplikasi.

2.4.3 Mekanisme Aktivitas Antioksidan terhadap Ekspresi *E-Cadherin* dan Regenerasi Jaringan Ginjal

Aktivitas senyawa asing berupa agen infeksi dan kimiawi menstimulasi respon protektif berupa inflamasi untuk eliminasi faktor penyebab dan inisiasi regenerasi sel (Kumar *et al.*, 2013). Proses pembentukan ATP oleh mitokondria sel inflamasi menghasilkan produk berupa radikal bebas (*free radical*). *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan radikal bebas yang normal diproduksi oleh sel sebagai hasil reduksi-oksidasi pada respirasi sel yang dinetralkan oleh antioksidan primer. Pada kondisi inflamasi, ROS dihasilkan dalam jumlah besar oleh neutrofil dan makrofag karena aktivitas fagositosis debris inflamasi sehingga menyebabkan peningkatan signifikan jumlah radikal bebas (Tao, 2013).

Radikal bebas mencari keseimbangan dengan pembentukan ikatan kovalen dengan membran lipid tak jenuh sehingga terjadi kerusakan membran sel karena peroksidasi lipid, modifikasi protein yang menyebabkan kesalahan sintesis protein dan kerusakan DNA berupa mutasi serta induksi kematian sel (Wresdiyati *et al.*, 2006). Tubuh terdapat mekanisme regulasi radikal bebas melalui pembentukan ikatan kovalen oleh antioksidan primer melalui donor elektron hidrogen gugus hidroksil yang mengubah radikal bebas menjadi senyawa nonreaktif. Peningkatan produksi ROS yang tidak seimbang dengan antioksidan primer menyebabkan kondisi stress oksidatif sehingga dibutuhkan antioksidan sekunder untuk mengikat radikal bebas reaktif (Kumar, 2013).

E-cadherin merupakan protein transmembran pada *adherens junction* (AJ) yang memegang peranan dalam agregasi sel, kohesi, pengatur dinamika kelompok antar sel tetangga dan komunikasi sel (Campbell *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2013).

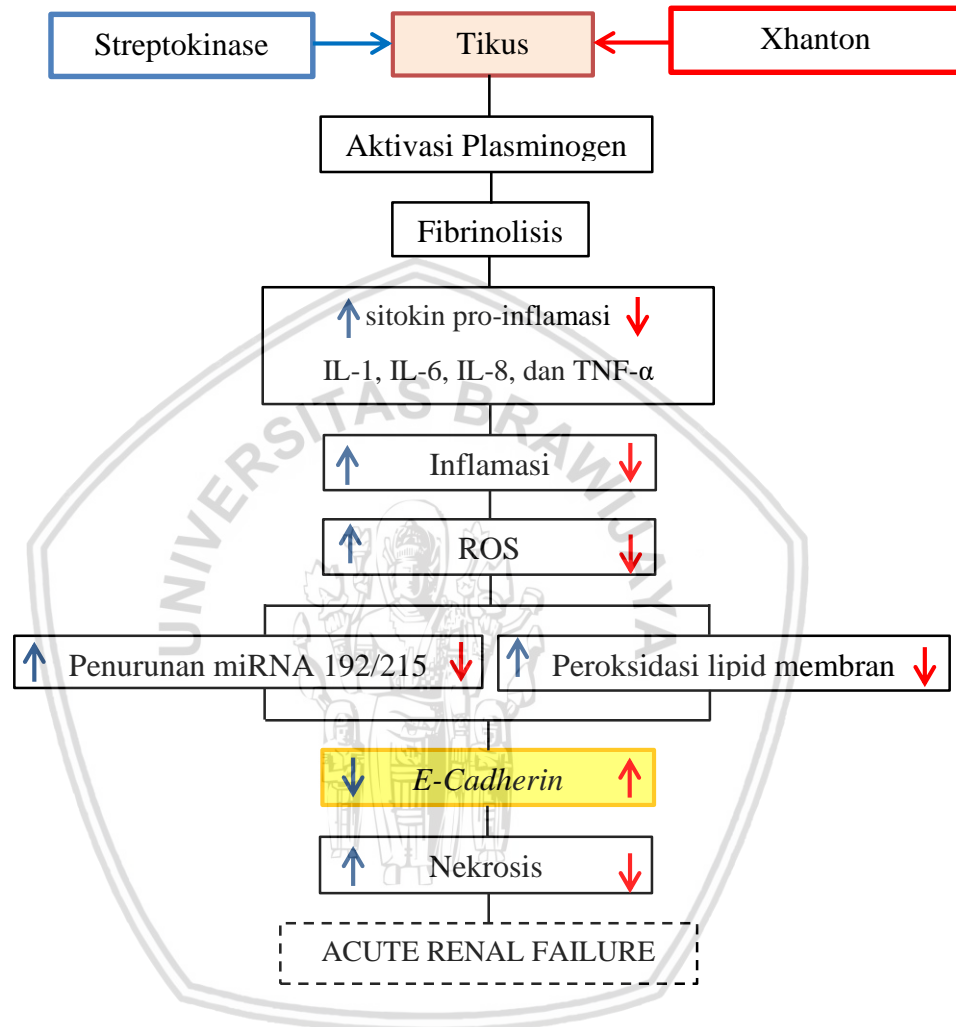
E-cadherin ditemukan pada *intercellular space* dengan ekspresi yang tampak jelas pada jaringan epitel (Tian *et. al*, 2011). Penurunan ekspresi *E-cadherin* berkaitan dengan translokasi Beta-catenin dari membran menuju nukleus menyebabkan hilangnya polaritas epitel (Aresu, 2008). Aktivitas ROS menyebabkan kerusakan DNA yang memodifikasi sintesis protein *E-cadherin* sehingga secara perlahan sel kehilangan dinamika antar sel (Kumar, 2013).



Xhanton merupakan turunan flavonoid yang termasuk golongan fenolik. Kerangka flavonoid terdiri dari satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen. Struktur cincin B hidroksil adalah struktur efektif yang berikatan dengan radikal bebas melalui donor hidrogen dan oksigen sehingga radikal bebas menjadi stabil dan mencegah *signalling* aktivitas mediator inflamasi. Saat peningkatan ROS, selain berperan *free radical scavenger*, xhanton sebagai antioksidan mengaktifasi pertahanan sel normal terhadap aktivitas radikal bebas sehingga mengurangi resiko kerusakan sel. Penurunan jumlah ROS oleh xhanton akan menghambat aktivitas mediator inflamasi dan memicu regenerasi jaringan. Aktivitas sitoprotektif pada xhanton berpotensi meningkatkan miRNA 192/215 berperan pada regulasi *E-cadherin* dan amplifikasi reseptor sel terhadap *growth factor* berupa TGF- α , EGF, PDGF, dan VEGF pada regenerasi jaringan pasca inflamasi akut (Wang, 2010; Kumar *et al.*, 2013). Pemberian terapi ekstrak kulit manggis berpotensi meminimalisir dampak kerusakan inflamasi dan menstimulasi pembentukan jaringan fungsional.

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan gambar :

- ↑ : efek streptokinase
- ↓ : efek terapi kulit manggis
- : Variabel kendali
- : Variabel tergantung
- : Variabel bebas
- : Stimulasi

Streptokinase dosis 6000 IU yang diinjeksi pada tikus berikatan dengan plasminogen membentuk streptokinase-plasminogen yang mengubah plasminogen

menjadi plasmin. Kemampuan plasmin terhadap aktivasi sistem fibrinolitik dan degradasi fibrin pada seluruh pembuluh darah menyebabkan kerusakan endotelial diseluruh organ. Plasmin mengaktivasi C3 dan C5 yang berperan dalam molekul adhesi yaitu selektin dan ligan dan peningkatan migrasi neutrofil ke jaringan oleh aktivitas $\beta 2$ integrin. Aktivasi komplemen C3 dan C5 menghasilkan fragmen kecil C3a dan C5a berupa anafilatoksin yang meningkatkan permeabilitas vaskuler dan kontraksi otot polos yang berperan dalam opsonisasi. Aktivasi komplemen C3a dan C5a menstimulasi migrasi sel fagosit mononuklear dan polimorfonuklear. Kerusakan endotelial oleh aktivitas streptokinase direspon oleh makrofag melalui sekresi sitokin pro-inflamasi sebagai protein fase akut (IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF- α) yang berperan dalam vasodilatasi dan permeabilitas vaskuler sehingga terbentuk akumulasi sel radang yang terdiri sel plasma, makrofag dan neutrofil pada jaringan inflamasi. Sitokin proinflamasi (TNF dan IL-1) menstimulasi ekspresi selektin dan integrin ligan pada endotelium, meningkatkan aviditas integrin terhadap ligan (kemokin) dan memicu rekrutmen dan migrasi leukosit. IL-1 akan menginduksi ekspresi molekul adhesi pada endotel sedangkan TNF- α akan meningkatkan ekspresi selektin-E yang kemudian menginduksi peningkatan ekspresi intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) dan vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) yang bersinergi dengan komplemen C3 dan C5 dalam rekrutmen sel polimorfonuklear.

Aktivitas fagositosis debris oleh neutrofil dan makrofag menghasilkan radikal bebas dari aktivitas oksidatif mitokondria berupa *Reactive Oxygen Species* (ROS). Secara fisiologis, ROS yang dihasilkan sebagai produk respirasi selular

dinetralisasi melalui pembentukan catalase oleh peroksisome, glutathione (GSH) dan superoxide dismutase (SOD) yang mengkatabolisme radikal bebas sedangkan kondisi patologis, ROS diproduksi oleh neutrofil dan makrofag pada mekanisme fagositosis debris dan substansi selama inflamasi berlangsung. ROS dihasilkan pada fagosom dan fagolisosom melalui proses serupa respirasi pada mitokondria.

Produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan tubuh menyebabkan kondisi stress oksidatif. Radikal bebas tidak berpasangan akan berusaha mencapai kestabilan dengan pembentukan ikatan pada molekul terdekat yaitu lipid, protein, dan asam nukleat untuk mendapatkan donor elektron sehingga terjadi destruksi sel sendiri maupun sel tetangga. ROS menyebabkan kerusakan sel melalui tiga reaksi inti yaitu (1) peroksidasi lipid membran apabila radikal bebas berikatan fosfolipid membran membentuk peroxy radical yang menyebabkan kerusakan sitoskeletal; (2) degradasi protein dan aktivitas enzimatik karena fragmentasi polipeptida; dan (3) pemutusan rantai DNA sehingga terjadi kematian sel dan transformasi sel. Ikatan ROS dan asam nukleat menyebabkan gangguan sintesis protein oleh miRNA 192/215 yang berperan dalam regulasi sintesis protein *E-Cadherin* dengan ZEB2 sehingga perlekatan antar sel epitel ginjal akan renggang dan tidak stabil. Pada kondisi normal, *E-cadherin* berikatan dengan catenin α , β , dan γ -catenin (plakoglobin) membentuk ikatan dan integritas sel yang kuat dengan meningkatkan kerapatan selular sedangkan pada kondisi patologis, *E-cadherin* berkaitan dengan translokasi β -catenin sehingga sel kehilangan polaritas dan integritas sel. Menurut penelitian Wang (2010), penurunan *E-cadherin* terjadi akibat aktivitas TGF- β yang menekan sintesis *E-cadherin*.

Penurunan sintesis *E-Cadherin* menyebabkan disfungsi komunikasi antar sel dan transpor molekul karena gangguan pada pompa ion dependen kalsium sehingga terjadi peningkatan influks Ca^{2+} yang menyebabkan degenerasi hidropik (*cloudy swelling*). Komplemen C5a meningkatkan permeabilitas membran sehingga terjadi peningkatan kalsium intraselular yang mengaktivasi fosfolipase yang menguraikan fosfolipid sehingga memicu produksi enzim protease berlebih yang akan merusak protein sel seperti *E-cadherin*. Peningkatan Ca^{2+} sitosolik disertai peningkatan permeabilitas mitokondria sehingga terjadi penurunan produksi ATP. Peningkatan Ca^{2+} sitosol mengaktivasi enzim seluler meliputi fosfolipase (menurunkan fosfolipid sel), protease (penurunan protein membran dan sitoskeletal), endonuklease (fragmentasi DNA) dan ATPase (depleksi ATP). Degenerasi ATP menyebabkan kegagalan metabolisme dan homeostasis sel sehingga memicu kematian sel (nekrosis).

Acute Renal Failure (ARF) ditandai dengan glomerular nekrosis dan tubulointerstitial nekrosis. Jumlah sel nekrosis berbanding lurus dengan aktivitas inflamasi dan berpotensi menjadi kegagalan fungsional secara permanen, oleh karena itu pemberian antioksidan sekunder diperlukan untuk pemutusan rantai produksi radikal bebas. Kandungan xanton yang tergolong turunan flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan melalui pembentukan ikatan kovalen gugus hidroksil antioksidan dengan elektron yang tidak berpasangan membentuk radikal bebas nonreaktif. Aktivitas antioksidan xanton menyebabkan penurunan signifikan jumlah ROS sehingga menekan produksi mediator inflamasi. Selama proses inflamasi, makrofag memproduksi immunosupresan berupa IL-10 sebagai

penghambat produksi sitokin proinflamasi pada makrofag. Sistem ini dibutuhkan untuk mencegah terjadinya inflamasi berlebih yang memicu kerusakan jaringan lebih lanjut. Apabila agen stimulan terlalu banyak dan respon inflamasi akut tidak mampu mengatasinya maka IL-10 akan terhambat sehingga inflamasi berjalan terus menerus dan menyebabkan kerusakan *irreversible*. Penurunan massa sel radang diperantarai oleh resolvin dan protektin dipengaruhi oleh sitokrom P450 yang menstimulasi keluarnya makrofag dari jaringan inflamasi melalui pembuluh limfatik (Ariel, 2007). Aktivitas sinergis IL-10 dengan antioksidan memicu apoptosis neutrofil dan makrofag. Aktivitas sitoprotektif xanton meningkatkan aktivitas miRNA 192/215 berperan pada regulasi *E-cadherin* dan amplifikasi reseptor sel terhadap *growth factor* berupa *platelet derived growth factor* (PDGF) yang berperan dalam aktivasi proliferasi sel, *transforming growth factor alfa* (TGF- α) yang menstimulasi proliferasi sel epitelial, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang memicu proliferasi sel endotelial, *epidermal growth factor* (EGF) yang berperan diferensiasi sel dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF) yang berperan menstimulasi angiogenesis pasca inflamasi akut (Wang, 2010; Kumar *et al.*, 2013). Regenerasi ditandai pembentukan sel kuboidal yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel fungsional.

3.2 Hipotesis

Pemberian terapi ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) dapat meningkatkan ekspresi *E-Cadherin* dan memperbaiki jaringan yang terdegradasi karena aktivitas streptokinase melalui pengamatan histopatologi pada ginjal tikus (*Rattus novergicus*) model *Acute Renal Failure*.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada Oktober 2014–April 2016 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan antara lain kandang pemeliharaan hewan coba, sonde lambung, kawat kasa, spuit 1 cc, wadah pakan, *dissecting set*, pot organ, timbangan, pipet tetes, cawan petri, gelas ukur 100 mL, pinset, *rotary evaporator*, wadah kaca, blender, oven, mikropipet, mikroliter, mikroskop, *cover glass*, *object glass*, mikrotom, penangas air, *ependorf*, lemari pendingin, pH meter digital, neraca analitik, oven, inkubator, vortex, mikroskop, dan *autoclave*.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan antara lain tikus putih (*Rattus novvergicus*) jantan strain Wistar berumur 10-12 minggu dengan berat 150-200 gram, sediaan pakan, air minum, streptokinase 6000 IU, akuades, *lactat ringer*, NaCl-fisiologis 0,9%, larutan paraformaldehid (PFA) 4%, xylol, etanol 60%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95% etanol absolut, 3% H₂O₂, antibodi sekunder berlabel biotin *antirabbit IgG biotin labeled*, antibodi primer *E-cadherin rabbit polyclonal IgG*, DAB, SA-HRP, mayet *Haematoxylin Eosin*, entelan, gliserin dan parafin.

4.3 Tahapan Penelitian

Skema kerja penelitian dapat dilihat dengan tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Rancangan penelitian
2. Persiapan hewan coba
3. Preparasi streptokinase
4. Pembuatan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*)
5. Induksi streptokinase pada hewan coba
6. Pemberian terapi ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*)
7. Pembedahan hewan coba dan isolasi organ ginjal
8. Pembuatan preparat histopatologi ginjal pewarnaan *Haematoxylin Eosin*
9. Pengamatan ekspresi *E-cadherin* dengan immunohistokimia
10. Pengamatan preparat histopatologi ginjal
11. Analisis data

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) (**Tabel 4.1**). Hewan coba pada penelitian eksperimental ini berupa tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar jantan, dibagi menjadi lima kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+), kelompok terapi dosis 200 mg/kg BB (T1), kelompok terapi dosis 400 mg/kg BB (T2) dan kelompok terapi dosis 600 mg/kg BB (T3) dengan masing-masing empat ulangan (**Tabel 4.2**).

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Variabel yang Diamati	Tikus ke-				Total	Rata-rata
Ekspresi E-cadherin	1	2	3	4		
1. K- (Kontrol negatif)						
2. K+ (Kontrol positif)						
3. T1 (200 mg/kg BB)						
4. T2 (400 mg/kg BB)						
5. T3 (600 mg/kg BB)						

Penggunaan hewan coba telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (**Lampiran 1**). Menurut Kusningrum (2008), jumlah total sampel dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 10$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan

Berdasarkan perhitungan tersebut maka, dengan adanya lima kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali setiap kelompok perlakuan sehingga jumlah total hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 ekor.

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- Variabel bebas : Dosis injeksi streptokinase dan ekstrak kulit manggis
- Variabel terikat : Ekspresi E-cadherin dan gambaran histopatologi ginjal
- Variabel kendali : Tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar jantan, berat badan 150-200 gram, umur ± 12 minggu, kondisi kandang pemeliharaan dan pemberian pakan sesuai standar

Tabel 4.2 Kelompok Perlakuan Tikus

Kelompok	Perlakuan
1. Kelompok K- (Kontrol negatif)	Tikus tanpa diberikan perlakuan
2. Kelompok K+ (Kontrol positif)	Tikus diberikan injeksi streptokinase dosis 6000 IU sebanyak 3 kali dengan selang waktu 5 hari tanpa diberikan terapi kuratif.
3. Kelompok T1 (Terapi dosis I)	Tikus diberikan injeksi streptokinase dosis 6000 IU sebanyak 3 kali dengan selang waktu 5 hari dan terapi ekstrak kulit manggis dosis 200 mg/kg BB selama 14 hari.
4. Kelompok T2 (Terapi dosis II)	Tikus diberikan injeksi streptokinase dosis 6000 IU sebanyak 3 kali dengan selang waktu 5 hari dan terapi ekstrak kulit manggis dosis 400 mg/kg BB selama 14 hari.
5. Kelompok T3 (Terapi dosis III)	Tikus diberikan injeksi streptokinase dosis 6000 IU sebanyak 3 kali dengan selang waktu 5 hari dan terapi ekstrak kulit manggis dosis 600 mg/kg BB selama 14 hari.

4.4.2 Persiapan Hewan Coba

Penelitian yang dilaksanakan telah mendapat surat laik etik penelitian dari Komite Etik Universitas Brawijaya Malang dengan nomor 322-KEP-UB. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 12 minggu. Hal ini sesuai pendapat Suckow (2006), bahwa umur 40-60 hari, tikus memasuki fase dewasa fisiologis. Tikus dipelihara dalam bak plastik berukuran 40x20x20 cm dengan alas sekam dilengkapi penutup kandang berbahan kawat kasa. Tikus diaklimatisasi selama tujuh hari pada suhu 22-25°C dengan kelembaban 50-60% dan ventilasi yang baik. Lokasi pemeliharaan terletak pada tempat bebas dari polusi suara dan udara serta polutan lainnya. Setiap individu diberikan pakan satu hari sekali dengan komposisi sesuai standar *Association of Analytical Communities* (AOAC, 2005) terdiri dari protein 20-25 %, lemak 3-5%,

serat kasar 8%, kalsium 0,8-1%, karbohidrat 45-50%, asam amino esensial, mineral esensial, karbohidrat, dan air minum adlibitum.

4.4.3 Preparasi Streptokinase

Sediaan streptokinase konsentrasi 1.500.000 IU dilarutkan dengan *ringer lactat* sebanyak 2 mL dan dihomogenkan (*Stock I*). Sediaan streptokinase *stock I* kemudian diambil 1 mL dan dilarutkan dengan *ringer lactat* hingga 5 mL, maka kandungan streptokinase menjadi 150.000 IU/mL (*Stock II*). Selanjutnya diambil 1 mL dari *stock II* dan disimpan sebagai *stock III*. Untuk memperoleh *stock III* dengan kandungan 6000 IU, digunakan rumus perbandingan senilai sebagai berikut:

$$1 \text{ mL} = 150.000 \text{ IU}$$

$$x = 6000 \text{ IU, maka } x = \frac{6000 \text{ IU}}{150.000} \times 1 \text{ mL}$$

$$x = 0,04 \text{ mL}$$

Pemberian injeksi streptokinase dibutuhkan dosis 6000 IU, setara dengan 40 μL *Stock II* dengan penambahan *lactat ringer* 60 μL yang bertujuan efisiensi dosis injeksi dan diulang sejumlah individu yang akan diinduksi (**Lampiran 4**).

4.4.4 Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*)

Pembuatan ekstrak kulit manggis dilakukan dengan metode maserasi dengan prinsip ekstraksi komponen kimia melalui perendaman serbuk simplisia dalam pelarut sesuai temperatur kamar. Etanol mempunyai indeks polaritas 5,4 sehingga diharapkan dapat menarik senyawa aktif dalam kulit manggis (Watson, 2009). Kulit manggis dicuci bersih dan dipotong kecil kemudian dikeringkan

dalam oven bersuhu 50°C hingga persentase kadar air yang tersisa sekitar 8-10%. Kulit manggis (*Garcinia mangostana*) kering kemudian diblender menjadi bubuk halus. Bubuk kulit manggis ditimbang 100 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambahkan satu liter etanol 90% pada suhu kamar selama 72 jam, lalu disaring. Ampas diremaserasi dengan 300 mL etanol 95% pada suhu kamar selama 48 jam, lalu disaring. Filtrat yang didapatkan dari filtrasi pertama dan kedua digabungkan dan disaring dengan kertas saring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, sehingga didapatkan ekstrak kental berwarna coklat kehitaman. Ekstrak diuapkan kembali dengan oven bersuhu 40°C untuk memperoleh ekstrak yang lebih padat. Ekstrak berbentuk pasta padat kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca dan disimpan dalam lemari pendingin (Dewi, 2014) (**Lampiran 6**).

4.4.5 Injeksi Streptokinase pada Hewan Coba

Injeksi streptokinase pada hewan coba dilakukan secara intravena melalui vena coccygea sebanyak tiga kali pasca aklimatisasi dengan interval lima hari yaitu pada hari ke-1, hari ke-6 dan hari ke-11 dengan dosis 6000 IU pada individu kelompok kontrol positif (K+), terapi dosis 200 mg/kgBB (T1), terapi dosis 400 mg/kgBB (T2) dan terapi dosis 600 mg/kgBB (T3) (Luqmana, 2014). Skema induksi streptokinase ditampilkan pada **Lampiran 2**.

4.4.6 Pemberian Terapi Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*)

Pemberian terapi kuratif ekstrak kulit manggis dilakukan dengan metode *force feeding* menggunakan sonde lambung sebanyak 2 mL/ekor/hari selama 14 hari berurutan dengan dosis 200 mg/kgBB (T1), 400 mg/kgBB (T2), dan 600

mg/kgBB (T3) (Mansour, 2013). Perhitungan dosis yang diberikan pada setiap individu pada kelompok perlakuan tertera pada **Lampiran 5**.

4.4.7 Pembedahan Hewan Coba dan Isolasi Organ Ginjal

Koleksi organ ginjal pada hewan coba dilakukan pada hari ke 16 pasca aklimatisasi. Langkah pertama yang dilakukan adalah euthanasia melalui dislokasi cervicalis dan pembedahan abdomen untuk pengambilan organ ginjal. Selanjutnya organ ginjal dibersihkan dengan NaCl-fisiologis 0,9%, kemudian dimasukkan dalam pot berpenutup berisi larutan paraformaldehid 4% (PFA) dan diproses lebih lanjut untuk pembuatan preparat histopatologi pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dan pengamatan ekspresi *E-cadherin* melalui imunohistokimia.

4.4.8 Pembuatan Preparat Ginjal Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Tahapan pembuatan preparat histopatologi ginjal terdiri dari fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, penempelan pada gelas objek dan tahap pewarnaan *haematoxylen eosin* (*staining*). Proses pembuatan preparat ginjal diawali dengan tahapan fiksasi melalui perendaman organ ginjal menggunakan larutan paraformaldehid 4% sebagai pertahanan komponen sitologi dan proses enzimatik seluler. Kemudian dilakukan dehidrasi dengan perendaman jaringan pada serangkaian alkohol dengan peningkatan konsentrasi perlahan dari etanol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% dan etanol absolut untuk meminimalisir pengkerutan jaringan. Etanol hasil tahapan dehidrasi tidak dapat tercampur parafin oleh karena itu, dilakukan penghilangan etanol dari jaringan melalui tahap penjernihan (*clearing*) dengan perendaman organ pada larutan xylol dan kreosot sesuai ketebalan dan tingkat kepadatan jaringan. Sel yang mengalami dehidrasi

akan digantikan oleh parafin melalui tahap infiltrasi parafin. Pada tahapan ini, jaringan dipindahkan dari medium penjernihan ke dalam parafin cair pada suhu titik leleh parafin di dalam oven. Apabila ketebalan irisan yang dikehendaki adalah 5-8 mikron, infiltrasi dilakukan pada titik leleh 56-58°C sedangkan apabila ketebalan irisan kurang dari 5 mikron maka infiltrasi dilakukan pada titik leleh 60-68°C. Jaringan dibiarkan selama satu jam didalam oven. Jaringan yang terinfiltrasi parafin kemudian dipindahkan dalam kontainer porcelen atau logam berisi parafin cair (*embedding*). Posisi organ diatur sesuai dengan orientasi pemotongan yang akan dilakukan. Kontainer dipindahkan ke dataran dingin supaya parafin mengeras. Blok parafin yang didinginkan dapat segera dirapikan dan dipotong dengan mikrotom.

Tahapan *sectioning* dilakukan untuk pengaturan tebal parafin di sekitar organ antara 1-2 mm. Selanjutnya dilakukan penempelan blok parafin pada papan blok yang terbuat dari kayu keras sebagai *block holder*. Selanjutnya dilakukan pemotongan menggunakan mikrotom putar dan terbentuk pita irisan. Pita irisan diletakkan di permukaan air untuk menghindari kerutan kemudian diambil menggunakan *object glass* yang telah diolesi Mayer's albumen. Langkah selanjutnya adalah deparafinisasi dengan perendaman pada xylol I dan xylol II selama 10 menit dan dilanjutkan dengan rehidrasi pada etanol absolut selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan perendaman bertingkat pada konsentrasi 95%, 90%, 80% dan 70% selama 30 detik pada setiap konsentrasi, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit untuk selanjutnya diwarnai dengan *haematoxylin* Mayer. Pewarnaan dilakukan dengan pemberian pewarna *haematoxylin* dengan

hasil warna biru (basofilik) pada inti sel dan eosin dengan hasil warna merah muda pada sitoplasma sel. Preparat kemudian ditetaskan pewarna *haematoxylin* selama 8 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit hingga berwarna kebiruan. Preparat kemudian dicelupkan pada etanol 95% 10 celupan, kemudian diwarnai dengan eosin selama 30 detik. Sediaan yang telah diwarnai, kemudian didehidrasi dengan etanol 95%, etanol absolut I dan etanol absolut 2 selama masing-masing 2 menit. Setelah itu dilakukan proses *clearing* dengan xylol I dan II selama 5 menit kemudian ditiriskan namun jangan sampai preparat kering untuk menghindari terbakarnya jaringan. Preparat kemudian dilakukan *mounting* canada balsam dan ditutup dengan *cover glass*. Tahapan pembuatan preparat pewarnaan HE secara lengkap tertera pada **Lampiran 7**.

4.4.9 Pengamatan Ekspresi E-cadherin dengan Imunohistokimia

Deteksi ekspresi *E-Cadherin* dilakukan menggunakan imunohistokimia (IHK) mengacu pada Fajar (2010) dengan modifikasi. Langkah pertama yang dilakukan adalah pemotongan blok parafin menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 μm untuk dijadikan pita parafin. Kemudian pita parafin diletakkan pada gelas objek yang telah di-*coating* dengan gelatin.

Tahapan awal terdiri dari deparafinisasi dengan perendaman pada larutan xylol I, xylol II, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%) dan aquadest selama 5 menit, kemudian dicuci dengan larutan PBS sebanyak 3 kali 5 menit dan ditetesi H_2O_2 3% selama 20 menit. Preparat kemudian dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali 5 menit dan diblok dengan BSA 1% dalam PBS selama 30 menit sesuai suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali 5 menit.

Tahapan selanjutnya adalah inkubasi pada antibodi primer (*E-cadherin rabbit polyclonal IgG*) selama 24 jam pada suhu 4°C, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali 5 menit. Slide preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rabbit IgG biotin labelled*) selama 1 jam pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali 5 menit. Preparat ditetesi enzim *Strept AvidinHorse Radish Peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali 5 menit dan ditetesi dengan DAB (*Diamono Benzidine*) selama 10 menit dengan suhu ruang sebagai substrat kromogen. Preparat dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali 5 menit dan dilakukan *counterstaining* menggunakan *Mayer Haematoxylin* selama 5 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir (**Lampiran 7**). Tahap terakhir adalah *mounting* dengan entellan dan ditutup dengan *cover glass*.

4.4.10 Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal

Preparat histopatologi diamati dengan mikroskop perbesaran 400x ditinjau dari perubahan struktur jaringan tubulus dan glomerulus ginjal pada preparat pewarnaan *haematoxylen eosin* dan ekspresi *E-cadherin* hasil imunohiskimia pada ginjal tikus model gagal ginjal akut pasca terapi ekstrak kulit manggis.

4.4.11 Analisis Data

Analisa data terdiri dari data kuantitatif dan kualitatif. Data kualitatif berupa hasil pengamatan histopatologi ginjal pewarnaan *Haematoxylin Eosin* sedangkan data kuantitatif merupakan data perhitungan ekspresi *E-cadherin* melalui aplikasi *Immunomembran* (jvsmicroscope.upi.fi) (Tuominen, 2016). Analisis data dilakukan dengan program aplikasi SPSS for windows versi 17.0.

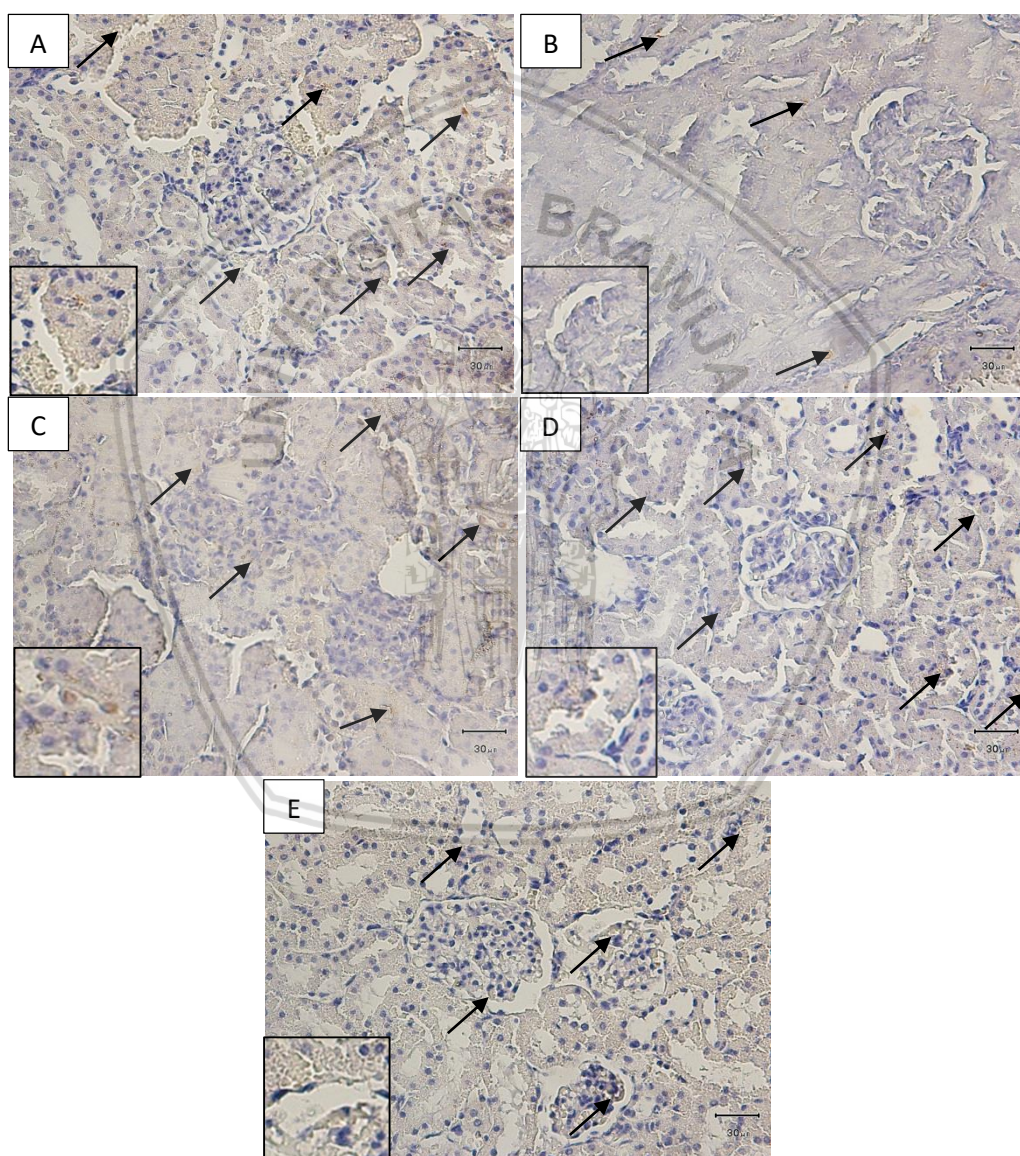
Data dianalisis dengan uji normalitas distribusi data pada setiap kelompok perlakuan dengan metode *Shapiro-Wilk* dikarenakan jumlah sampel ≤ 50 . Analisis statistika terhadap ada/tidaknya perbedaan tingkat signifikansi antar rerata setiap kelompok data pada pengujian lebih dari dua sampel digunakan uji parametrik *One-Way ANOVA (Analysis of Variance)* dengan asumsi, data termasuk data ratio dan interval, sebaran data setiap kelompok sampel terdistribusi normal, varian sama, dan bersifat independen. Uji perbandingan antar kelompok dilakukan dengan Uji Tukey ($p < 0,05$).



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekpresi *E-cadherin* pada Ginjal Tikus (*Rattus novergicus*) Model *Acute Renal Failure* Hasil Terapi Ekstrak Kulit Manggis

Ekspresi *E-Cadherin* pada ginjal tikus (*Rattus novergicus*) kelompok kontrol dan kelompok terapi ditunjukkan pada Gambar 5.1 dan Tabel 5.1



Gambar 5.1 Ekpresi *E-cadherin* pada tikus model ARF (Perbesaran 400x).

Keterangan: A= ginjal kelompok kontrol negatif (K-); B= ginjal kelompok tikus kontrol positif (K+); C= ginjal kelompok terapi dosis 200 mg/kgBB (T1); D= ginjal kelompok terapi dosis 400 mg/kgBB (T2); dan E= ginjal kelompok terapi dosis 600 mg/kgBB (T3)

Ekspresi *E-cadherin* pada jaringan ginjal tikus ditunjukkan dengan warna kecoklatan karena ikatan antara antigen *E-cadherin* membran sel dan antibodi *E-cadherin rabbit polyclonal* yang dikenali antibodi sekunder *antirabbit biotin labeled* dan ditambahkan *Streptavidin–Horseradish Peroxidase* (SA-HRP) serta substrat berupa *Diaminobenzidine* (DAB). Warna kecoklatan ditunjukkan dengan tanda panah (↑) pada membran sel glomerulus dan tubulus ginjal. Ekspresi *E-cadherin* pada kelompok tikus kontrol positif digunakan sebagai pembanding terhadap peningkatan *E-cadherin* dan efektivitas pemberian terapi ekstrak kulit manggis pada hewan model *Acute Renal Failure* sedangkan kelompok tikus kontrol negatif digunakan untuk menentukan dosis optimal terapi ekstrak kulit manggis ditinjau dari tingkat regenerasi jaringan terhadap kondisi normal.

Ekspresi *E-cadherin* paling banyak ditunjukkan kelompok kontrol negatif (A) pada daerah tubulus dibandingkan kelompok kontrol positif (B). Menurut pendapat Aresu (2008), ekspresi *E-cadherin* divisualisasi pada sel normal sebagai protein transmembran dan adhesi sel. Pada kelompok kontrol positif (B), ekspresi *E-cadherin* paling sedikit dan cenderung jarang dibandingkan empat kelompok lainnya karena destruksi protein membran dan pembentukan jaringan nekrotik pasca induksi streptokinase. Pada kelompok terapi ekstrak kulit manggis dosis 200 mg/kgBB (C), 400 mg/kgBB (D) dan 600 mg/kgBB (E) mempunyai area kecoklatan yang lebih banyak dibandingkan kontrol positif (B). Kelompok terapi (D) dosis 400 mg/kgBB mempunyai ekspresi kecoklatan paling banyak diantara kelompok terapi lainnya dan mendekati kontrol negatif. Hal ini didukung dengan pengamatan menggunakan aplikasi *Immunomembran* pada Tabel 5.1.

Hasil *Immunomembran* (jvsmicroscope.uta.fi) terdiri data ranking meliputi kelengkapan sel (*completeness*) dan intensitas pewarnaan membran sel (*intensity*). Membran sel berstruktur kokoh (*strong*) ditunjukkan warna merah, membran sel berstruktur lemah (*weak*) ditunjukkan warna hijau sedangkan membran sel yang tidak terwarnai merupakan sel yang tidak mengekspresikan *E-cadherin*. Ekspresi *E-cadherin* dengan poin 0-3 digolongkan pada 0/1+ dengan persentase antara 0-15% , 4-9 poin pada golongan 2+ dengan persentase 20-45%, sedangkan 10-20 poin pada golongan 3+ dengan persentase 50-100% (Tuominen, 2016). Intensitas ekspresi digolongkan menjadi empat yaitu *very strong*, *strong*, *weak* dan *very weak*. Berdasarkan pengamatan imunohistokimia, intensitas ekspresi *E-Cadherin* tergolong *very weak* yang menyebabkan kesulitan pada perhitungan kasat mata sehingga digunakan *Immunomembran*. Hasil pengamatan *Immunomembran* dapat dilihat pada **Lampiran 10**.

Tabel 5.1 Tabel Ekspresi *E-cadherin*

Kelompok	Rata-Rata Ekspresi <i>E-cadherin</i> (%)	Peningkatan (%)	Penurunan (%)
1. K- (Kontrol negatif)	77,75 ± 1,707 ^d	-	-
2. K+ (Kontrol positif)	21,25 ± 2,629 ^a	-	72
3. T1 (200 mg/kgBB)	44,75 ± 4,272 ^b	52	-
4. T2 (400 mg/kgBB)	72,25 ± 2,500 ^{cd}	70	-
5. T3 (600 mg/kgBB)	66,25 ± 3,095 ^c	67	-

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).
 Persentase peningkatan terhadap kontrol positif. Persentase penurunan terhadap kontrol negatif

Hasil rata-rata ekspresi *E-cadherin* Tabel 5.1 didapatkan menggunakan perhitungan persentase ekspresi dari 5 lapang pandang perbesaran 400x pada setiap ulangan. Tabel 5.1 menunjukkan *E-cadherin* terekspresi lebih banyak pada jaringan ginjal kelompok kontrol negatif (77,75 ± 1,707)% dibandingkan dengan

kelompok yang diinduksi streptokinase. Ekspresi paling sedikit ditunjukkan pada kelompok kontrol positif (K+) yaitu $(21,25 \pm 2,629)\%$.

Persentase area pada kelompok kontrol negatif digunakan sebagai acuan terhadap penurunan sedangkan persentase kelompok kontrol positif digunakan sebagai acuan peningkatan ekspresi akibat perlakuan. Persentase *E-cadherin* pada T1 dengan pemberian terapi kuratif ekstrak kulit manggis dosis 200 mg/KgBB (T1) selama 14 hari menghasilkan ekspresi $(44,75 \pm 4,272)\%$ dengan peningkatan 52% dibandingkan kontrol positif (K+). Pada pemberian terapi kuratif ekstrak kulit manggis dosis 400 mg/KgBB (T2) dihasilkan ekspresi total sebesar $(72,25 \pm 2,500)\%$ dengan peningkatan 70% dibandingkan kontrol positif. Sedangkan pada pemberian terapi ekstrak kulit buah manggis dosis 600 mg/KgBB (T3) dihasilkan persentase ekspresi *E-cadherin* sebesar $(66,25 \pm 3,095)\%$ dengan peningkatan 67% dibandingkan kontrol positif (K+). Hasil analisa statistik menunjukkan ada penurunan *E-cadherin* di membran sel penyusun tubulus dan glomerulus pada kontrol positif karena aktivitas nefrotoksik streptokinase. Berdasarkan uji (*One Way ANOVA*) yang dilanjutkan uji Tukey menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$) kecuali pada kelompok T2 terhadap kontrol negatif. Hal ini sesuai dengan penelitian Masniari *et al.* (2010), bahwa xhanton terbukti mampu menghambat produksi ROS dan menstimulasi regenerasi.

Peningkatan ekspresi *E-cadherin* dapat diartikan bahwa penggunaan ekstrak kulit manggis pada penelitian ini dapat berperan sebagai antioksidan yang menurunkan efek radikal bebas yang terbentuk karena inflamasi. Berdasarkan uji perbandingan signifikansi antar kelompok diperoleh hasil ekspresi *E-cadherin*

terbanyak ditunjukkan pada kelompok T2 terhadap kelompok kontrol dengan dosis terapi ekstrak kulit manggis 400 mg/kgBB. Perhitungan uji statistik secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 8.

Induksi Streptokinase secara intravena dosis 6000 IU sebanyak tiga kali dengan interval 6 hari menyebabkan aktivasi plasmin berlebihan sehingga terjadi fibrinolisis yang luas. Hasil degradasi fibrin (*fibrin degradation product*) dari hasil destruksi sel terakumulasi di lumen tubulus memicu migrasi makrofag (Wati *et al.*, 2013). Aktivitas fagositosis oleh leukosit polimorfonuklear yaitu neutrofil dan makrofag sebagai respon inflamasi akut menghasilkan produk hasil oksidasi mitokondria berupa *Reactive Oxygen Species* (ROS). Senyawa radikal bebas reaktif memiliki elektron tidak berpasangan dan berpotensi membentuk ikatan dengan molekul biologis seperti protein, lipid, dan asam nukleat untuk mencapai keseimbangan. Pada jumlah toleran, ROS dinetralkan antioksidan endogen seperti *superoxide dismutase* (SOD), *glutathion peroxidase* dan *catalase* menjadi senyawa non-radikal. ROS menyebabkan kerusakan sel melalui tiga jalur inti yaitu yaitu (1) peroksidasi lipid membran apabila ROS berikatan dengan fosfolipid membran sehingga rantai asam lemak terputus membentuk peroxy radical; (2) degradasi protein karena fragmentasi polipeptida; dan (3) kerusakan DNA karena ikatan radikal bebas dengan timin pada DNA nuklear dan mitokondrial menyebabkan pemutusan rantai DNA sehingga terjadi kematian sel, penuaan dan transformasi sel (Bender, 2009; Victor, 2003). Kerusakan asam nukleat berdampak pada kegagalan sintesis enzim, reseptor, dan protein yaitu modifikasi miRNA 192/215 sehingga berkurangnya regulasi *E-cadherin* (Wang,

2010). Hal ini sesuai pendapat Bossche (2011), penurunan *E-cadherin* menyebabkan kerenggangan sel, gangguan komunikasi selular, dan nekrosis. ROS tidak hanya berdampak pada sel tetangga tetapi pada sel penghasil itu sendiri.

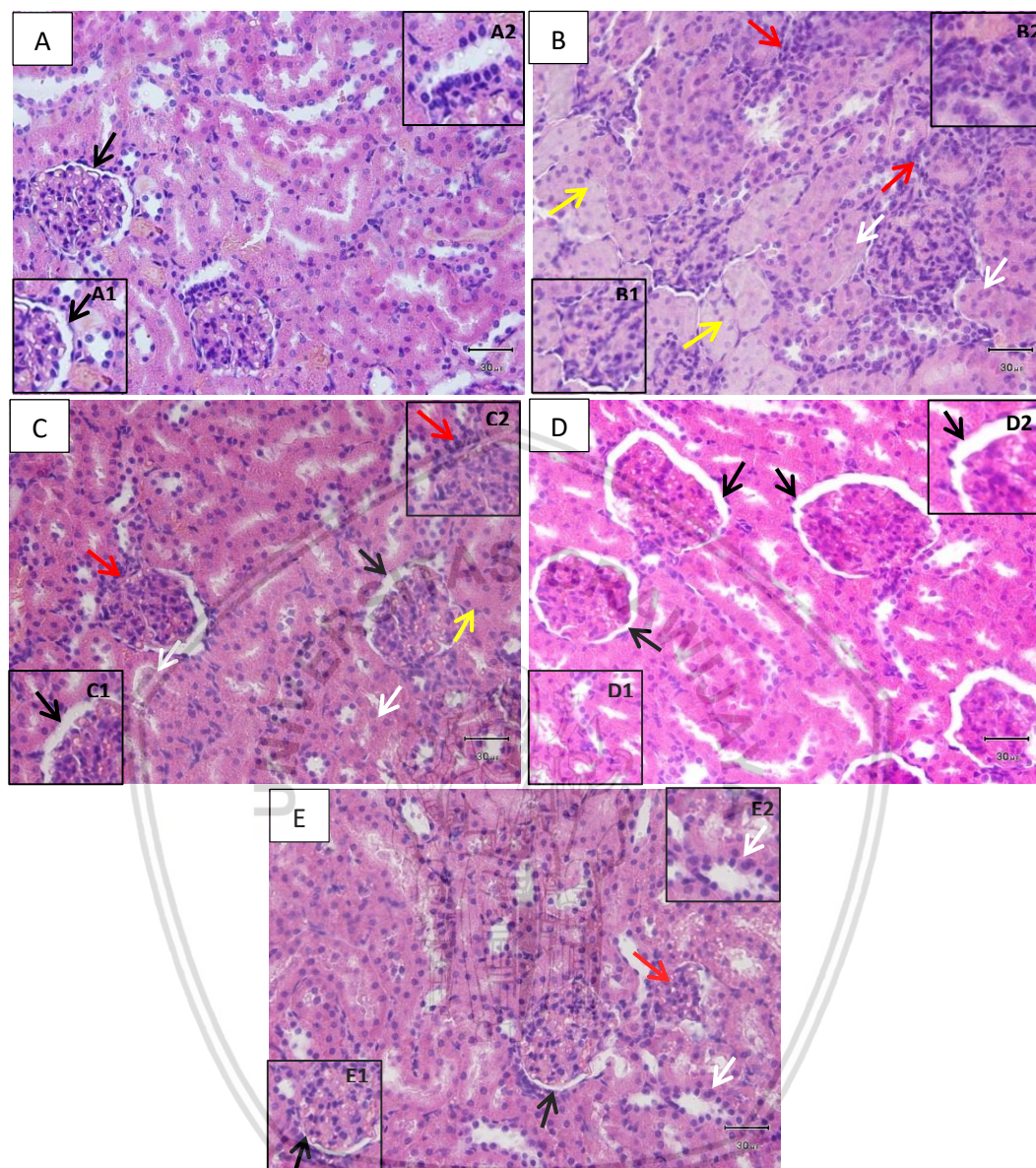
Fibrinolisis memacu aktivitas trombosit sebagai respon akut trauma melalui produksi *growth factor* (TGF- α , EGF, PDGF, dan VEGF) yang berperan pada angiogenesis, diferensiasi sel, serta proliferasi sel mesenkimal dan epitelial (Foster, 2009). Regenerasi dipengaruhi produktivitas sel terhadap substansi *growth promoting* dan reseptor membran terhadap faktor pertumbuhan. Pada kondisi stress oksidatif reseptor tidak dapat menerima sinyal promotor *growth factor* karena gangguan aktivitas seluler oleh ROS sehingga sel tidak terstimulasi meregenerasi komponen sel yang terdegradasi. Ginjal merupakan lokasi sintesis prekursor EGF yang menginduksi *autocrine pathways* menghasilkan promotor pembentuk organel sel, proliferasi sel epitelial dan non-epitelial (Ho *et al.*, 2002; Humes, 2017).

Peran *xhantones* sebagai antioksidan adalah menurunkan ROS intraseluler melalui pemutusan rantai produksi senyawa radikal bebas (*chain-breaking anti-oxidant*) dengan pembentukan ikatan kovalen membentuk senyawa nonreaktif, menekan produksi sitokin inflamasi dan menetralkan radikal bebas ekstraseluler (Sofna, 2014; Nijveld, 2001). Penurunan ROS disertai penurunan akumulasi sel radang (makrofag, sel plasma, dan neutrofil) diperantarai oleh resolvin dan protektin yang menstimulasi keluarnya makrofag dari jaringan inflamasi melalui pembuluh limfatik. Aktivitas sinergis bersama antioksidan menyebabkan *trigger apoptosis* pada neutrofil dan makrofag (Ariel, 2007; Orrenius *et al.*, 2007).

Aktivitas sitoprotektif pada xhanton dapat menekan produksi ROS sehingga terjadi peningkatan produksi reseptor dan kepekaan respon terhadap sinyal promotor *growth factor* yang menstimulasi mitogenesis ginjal. Penurunan ROS mengurangi aktivitas peroksidasi lipid membran yang menyebabkan degenerasi membran sel. Hal ini sesuai pendapat Asih (2008) dan Purwanto (2010) bahwa xhanton mempunyai aktivitas sitoprotektif terhadap senyawa radikal bebas. Regenerasi sel ditandai peningkatan ekspresi *E-cadherin* pada sel yang telah terdegradasi pasca inflamasi akut.

5.2 Histopatologi Ginjal Tikus Model *Acute Renal Failure* dengan Terapi Ekstrak Kulit Manggis

Karakteristik *Acute Renal Failure* secara histopatologi adalah dijumpainya nekrosis pada segmen tubulus (tubulus kontortus proximal), interstisial edema karena penimunan matrik interseluler dan akumulasi polimorfonuklear leukosit, makrofag dan sel plasma. Kerusakan glomerulus dan tubular ditandai dengan lepasnya sel epitel dari membran basalis (*sloughing*), lepasnya *brush borders* tubulus proksimal, akumulasi sel radang sebagai respon normal inflamasi terhadap faktor stimulan, sitoplasma sel berwarna asidofilik dibandingkan keadaan normal dan adanya degenerasi hidropik sebagai pertanda fase awal kematian sel. Ginjal menanggapi sinyal regenerasi dengan pembentukan jaringan epitel diawali dengan sel kuboidal dan aktivitas mitotik pada area tubular, selanjutnya mengalami difesensiasi menjadi sel *squamous* (Kumar, 2013). Jaringan yang mengalami regenerasi akan menunjukkan penurunan akumulasi sel radang dan jaringan nekrotik digantikan dengan jaringan baru fungsional yang terdiferensiasi.



Gambar 5.2 Histopatologi Ginjal Tikus Perlakuan (Perbesaran 400x)

Keterangan: (A) ginjal tikus kontrol negatif; (B) ginjal tikus kontrol positif; (C) ginjal tikus terapi dosis 200 mg/kgBB; (D) ginjal tikus terapi dosis 400 mg/kgBB; (E) ginjal tikus terapi dosis 600 mg/kgBB; (↑) epitel glomerulus normal; (↑) nekrosis; (↑) sel radang (↑) *cloudy swelling*
 Gambar insert: (A1) epitel *capsula bowman* normal; (A2) makula densa normal; (B1) epitel *capsula bowman* tidak jelas; (B2) ruptur pembuluh darah dan infiltrasi sel radang; (C1) epitel *capsula bowman* mulai terbentuk; (C2) massa sel radang; (D1) epitel tubulus proksimal terlihat normal; (D2) epitel glomerulus kembali normal; (E1) *capsula* Bowman tidak kompak; (E2) epitel tubulus mulai mengalami regenerasi.

Gambaran histopatologi menunjukkan perbedaan jaringan pada kelompok terapi terhadap kontrol. Pada kelompok kontrol negatif (A) yang tidak diinduksi

streptokinase menunjukkan sel penyusun kospuskula renalis normal dan kompak dengan inti sel dan sitoplasma yang jelas. *Capsula Bowman* yang tersusun dari sel epitel pipih selapis terlihat jelas dan utuh disertai bowman space yang luas. Batas antara membran basalis dan sel epitel jelas. Epitel tubulus terlihat normal dengan bentuk kuboidal selapis disertai *brush border* pada tubulus proksimal tersusun rapat dan teratur. Hal ini sesuai dengan gambaran histologi normal ginjal menurut Junquiera (2013) bahwa sel sel penyusun ginjal terdiri dari sel epitel simpleks dan koboidal simpleks pada daerah glomerulus dan tubulus.

Pada kontrol positif (B) pemecahan fibrin oleh aktivitas streptokinase yang menyebabkan rupturnya pembuluh darah dan terjadi infiltrasi sel darah merah ke jaringan interstisial menyebabkan inflamasi. Kerusakan jaringan akan ditanggapi makrofag melalui produksi sitokin pro-inflamasi (IL-1 dan TNF) yang berperan dalam marginasi dan migrasi neutrofil. Neutrofil akan bermigrasi melalui ikatan antara selektin dan ligan pada endotelium sebagai respon terhadap TNF yang bekerja sinergis dengan C3 dan C5 dalam permeabilitas membran dan opsonisasi. Neutrofil dan makrofag melakukan ekstrasvasi membentuk massa sel radang dan terjadi akumulasi matriks ekstraselular pada bagian mesangial, lepasnya epitel glomerular dan tubular, dan pembentukan jaringan nekrotik, yang tidak ditemukan pada kelompok kontrol negatif (K-). Pada kontrol positif ditunjukkan adanya destruksi inti sel meliputi piknosis (pengerutan inti), karioreksis (pemecahan inti), dan kariolisis (peleburan inti). Setelah sel lisis, sel kehilangan polaritas sehingga batas antar sel tidak terlihat jelas karena degradasi protein transmembran. Proliferasi glomerular menyebabkan penyusutan ruang Bowman dan adhesi antara

lapisan viseral dan parietal menyebabkan gangguan vaskularisasi peritubular dan berpotensi mengalirkan molekul asing ke tubulus kontortus sehingga terjadi peningkatan tekanan intraglomerular (Suhita *et al.*, 2013).

Nekrosis ditandai dengan degenerasi hidropik (*cloudy swelling*) karena kegagalan fungsi metabolik seluler akibat peningkatan Ca^{2+} interselular yang disebabkan gangguan pompa dependen ion Ca^{2+} pada membran sel sehingga berpengaruh terhadap transportasi molekul transmembran, denaturasi protein karena kegagalan sintesis protein, serta kerusakan organel sel karena kebocoran enzim pada lisosom ke sitoplasma sel sehingga sel memecah komponen penyusun sel tersebut. Pada hewan model ARF, nekrosis disebabkan oleh aktivitas ROS dari hasil metabolisme neutrofil dan makrofag pada fagositosis. Produksi ROS yang tidak seimbang dengan jumlah antioksidan endogen (primer) menyebabkan stress oksidatif sehingga ROS berikatan dengan molekul seluler (protein, fosfolipid dan asam nukleat) untuk mencapai keseimbangan molekul. Terbentuknya ikatan ROS dengan fosfolipida menyebabkan gangguan transport molekul karena influx Ca^{2+} karena gangguan pompa dependen kalsium pada membran sehingga terjadi *cloudy swelling*; ikatan antara ROS dan asam nukleat menyebabkan penurunan sintesis protein; ikatan dengan komponen mitokondria menyebabkan deplesi glikogen dan akumulasi asam laktat sehingga menurunkan pH intraseluler.

Pemberian terapi ekstrak kulit manggis pada T1 (200 mg/KgBB), T2 (400 mg/KgBB), dan T3 (600 mg/KgBB) berpengaruh terhadap regenerasi sel ditinjau dari penurunan akumulasi matriks ekstraseluler dan intraseluler, proliferasi sel, dan penurunan akumulasi sel radang karena penekanan aktivitas dan produktivitas

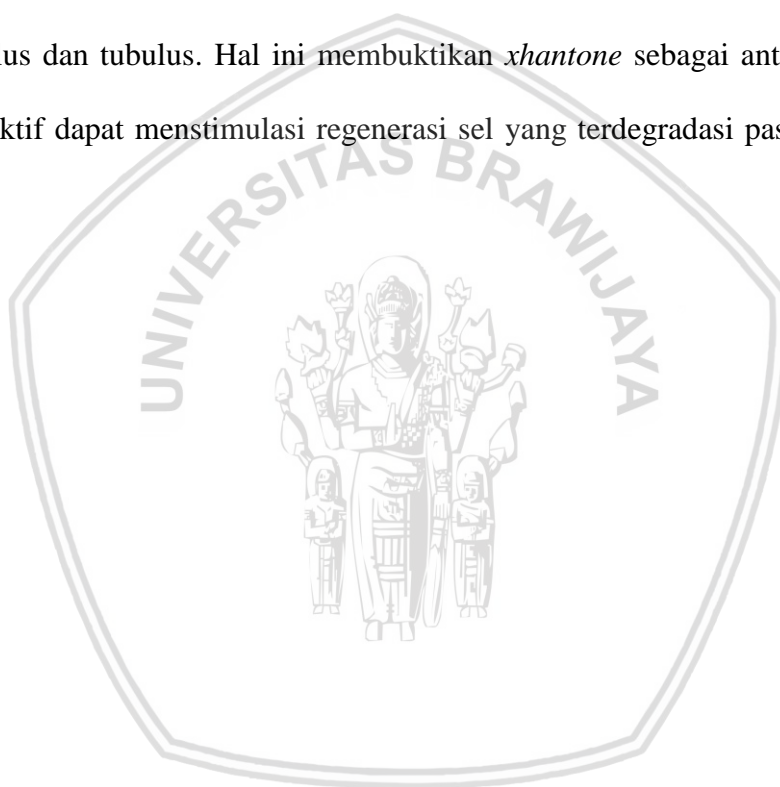
mediator inflamasi. Pada terapi dosis 200 mg/kgBB (T1) pada gambar C telah ditunjukkan adanya regenerasi jaringan dengan adanya diferensiasi sel epitel pada tubulus dan glomerulus walaupun masih dijumpai jaringan nekrotik, kerusakan vaskuler dan akumulasi sel radang. *Cloudy swelling* masih dijumpai pada preparat histopatologi yang dapat disimpulkan bahwa aktivitas nekrosis masih terjadi. Pada kelompok T2 (D) secara keseluruhan struktur jaringan serupa kontrol negatif, sel epitel tersusun rapi pada membran basalis, tidak terdapat massa sel radang dan jaringan nekrotik, dan struktur sel tergolong kompak dengan batas sel yang jelas. Peningkatan dosis pada kelompok T3 (E) tidak berjalan linier dengan tingkat regenerasi jaringan, hal ini ditunjukkan adanya massa sel radang pada glomerulus tetapi epitelial pada glomerulus dan tubulus telah teregenerasi secara bertahap. Menurut Anggriani (2008), kerusakan ginjal berhubungan dengan kemampuan absorpsi ginjal terhadap konsentrasi substansi darah. Peningkatan dosis pada T3 berpotensi menyebabkan degradasi epitel tubulus ginjal karena laju reabsorpsi yang tinggi dengan sehingga berpotensi menyebabkan respon toksik. Hal ini sesuai dengan penelitian Pongphasuk (2005) bahwa pemberian ekstrak pericarp *Garcinia mangostana* pada dosis diatas 10.000 mg/KgBB yang diberikan tidak menyebabkan kematian pada 24 jam tetapi pemberian berulang selama satu minggu menyebabkan peningkatan *direct bilirubin* sebagai keadaan patologis hati.

Aktivitas *xhantone* sebagai antioksidan dalam penelitian ini dilihat dari regenerasi jaringan pada gambaran histopatologi per dosis terapi ekstrak kulit buah manggis yang mengalami peningkatan pada T1, T2 dan T3 dibandingkan kontrol negatif (K-) seiring peningkatan dosis yang diberikan. Hal ini sesuai dengan

penelitian Chomnawang *et. al.*, (2007) bahwa ekstrak kulit buah manggis menunjukkan aktivitas signifikan dalam menghambat pembentukan 50% *Reactive Oxygen Species* dan menetralkan radikal bebas reaktif. Penurunan produksi ROS menyebabkan amplifikasi reseptor pada membran terhadap *growth factor* (TGF- α , EGF, PDGF, dan VEGF) berperan pada angiogenesis, diferensiasi, serta proliferasi sel mesenkimal dan epitelial melalui mitosis. Pemberian antioksidan tambahan berupa xanton dalam ekstrak pericarp kulit manggis dapat memenuhi kebutuhan tubuh terhadap antioksidan dalam menetralkan radikal bebas. Xanton akan berikatan dengan radikal bebas sehingga terjadi penurunan aktivitas ROS dan menekan aktivitas fagositosis dan produksi mediator inflamasi pada sel-sel polimorfonuklear dan makrofag melalui induksi trigger apoptosis yang dipicu oleh antioksidan. Aktivitas yang sinergis antara antioksidan dan resolvin protektin menginduksi apoptosis pada sel produsen ROS yaitu neutrofil, makrofag, dan sel plasma.

Kerusakan sel oleh reaksi inflamasi akut akan direspon oleh *growth factor* untuk regenerasi pembuluh darah sebagai awal perbaikan jaringan untuk suplai oksigen dan transport molekul yang dibutuhkan dalam angiogenesis. Stimulan angiogenesis berupa *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factors* (bFGF), *platelet-derived growth factors* (PDGF), dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), angiogenesis stimulator bekerja secara langsung dengan merangsang proliferasi (perbanyak) dan migrasi dari sel endotel (pelapis pembuluh darah). VEGF bertanggung jawab terhadap peningkatan permeabilitas, vasodilatasi (pelebaran pembuluh darah), dan pembentukan pembuluh darah baru.

VEGF diekspresikan sebagai respon peningkatan kebutuhan akan oksigen dan nutrisi di sel. PDGF memicu proses mitosis dari sel fibroblas dan otot polos. EGF (*Epidermal Growth Factor*) berperan pada regenerasi mesenkim, dan $\text{TNF-}\alpha$ berperan dalam diferensiasi dari sel kuboidal menjadi squamous pada jaringan epitelial. Regenerasi jaringan ginjal ditandai dengan proliferasi sel kuboidal yang berdifensiasi menjadi jaringan epitelial, mesenkim, dan endotel penyusun glomerulus dan tubulus. Hal ini membuktikan *xhantone* sebagai antioksidan dan sitoprotektif dapat menstimulasi regenerasi sel yang terdegradasi pasca inflamasi akut.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Pemberian terapi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana*) pada tikus putih (*Rattus novergicus*) model *Acute Renal Failure* hasil induksi streptokinase menunjukkan kecenderungan peningkatan ekspresi *E-cadherin* dengan dosis terbaik adalah 400 mg/kgBB (T2).
2. Pemberian terapi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana*) pada tikus putih (*Rattus novergicus*) model *Acute Renal Failure* menunjukkan regenerasi sel dengan hasil terbaik pada dosis 400 mg/kgBB (T2)

6.2 Saran

Adapun saran untuk penelitian selanjutnya yaitu :

1. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut tentang uji toksisitas ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) pada kasus gagal ginjal akut.
2. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dalam perbaikan jaringan ditinjau dari aktivitas zat aktif pada suatu kasus penyakit.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 2005. Official Methods Of Analysis Of AOAC International. 2 Vol. 16. Arlington VA. USA. Association of Analytical Community.
- Abbas, K.A., Lichtman, H. Andrew and Pillai, Shiv. 2015. *Cellular and Molecular Immunology Eight Edition*. Elsevier Saunders. Philadelphia.
- Akao, Y., Y. Nakagawa, M. Inuma, dan Y. Nozawa. 2008. Anti-Cancer Effects of Xanthones from Pericarps of Mangosteen. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 355-70.
- Aresu, L. and M.P Rastaldi. 2008. Dog as model for down expression of E-cadherin and B-catenin in tubular epithelial cells in renal fibrosis. Renal Research Laboratory. Italy.
- Ariel, A., and C.N. Serhan. 2007. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunology*. 28, 176–183.
- Armitage, D. 2004. *Rattus Norvegicus*. Animal Diversity Web. University of Michigan of Zoology.
- Aru. W. Sudoyo. 2007. *Ilmu Penyakit Dalam Edisi 4 Volume 1*. Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 574.
- Bender DA. 2009. Free Radicals an Antioxidant Nutrients. In: Murray K, Bender DA, Botham KM, et al. Eds. Harper's Illustrated Biochemistry, Ed 28th Mc Graw Hill. 482 – 86.
- Bijanti, R., M.G.A. Yuliani, R.S. Wahjuni dan R.B. Utomo. 2010. Patologi Klinik Veteriner. 1st edition. Airlangga University Press. Surabaya : 59-62
- Böckmann S. and I. Paegelow. 2000. Kinins receptors: importance for the activation of leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 68(5) : 587-592.
- Boor, P. and J. Floege. 2011. Chronic kidney disease growth factor in renal fibrosis. Clin Exp Pharmacology and Physiology. Germany
- Botham , KM, P.A. Mayes. 2009. Biologic Oxidation. In: Murray K, Bender DA, Botham KM, et al. Eds. Harper's Illustrated Biochemistry, Ed 28th Mc Graw Hill : 98 – 102
- Campbell, N.A., J.B. Reece and L.G. Mitchell. 2006. Biologi-Edisi Kelima-Jilid III. Addison Wesley Longman, Inc.
- Chang, H. F., W.T. Huang, H.J. Chen, dan L.L. Yang. 2010. Apoptotic Effects of γ -Mangostin from The Fruit Hull of *Garcinia mangostana* on Human Malignant Glioma Cells. *Molecules*. 15: 8953-66.

- Chatziantoniou. 2005. Insights Into the Mechanism of Renal Fibrosis: Is it Possible to Achieve Regression? *Am J Physiol*, 289(2):F227-34.
- Chitchumroonchokchai, C., K.M. Riedl, S. Suksumrarn, S.K. Clinton, A.D. Kinghorn, dan M.L. Failla. 2012. Xanthones in Mangosteen Juice are Absorbed and Partially Conjugated by Healthy Adults. *The Journal of Nutrition*. 142: 675–80.
- Chivapat, S., P. Chavalittumrong, P. Wongsinkongman, C. Phisalpong, dan A. Rungsipipat. 2011. Chronic Toxicity Study of *Garcinia mangostana* Linn. Pericarp Extract. *Thai. J. Vet. Med.* 41(1): 45-53.
- Cho, Min Hyun. 2010. Renal Fibrosis. di dalam Korean *J Pediatr* 2010. Daegu: Kyungpook National University School of Medicine. Hlm 735-740
- Chomnawang, M. T., S. Surassmo, V.S. Nukoolkarn, dan W. Gritsanapan. 2007. Effect of *Garcinia mangostana* L. on Inflammation Caused by *Propionibacterium acnes*. *Fitoterapia*. 78 : 401–8.
- Cui, M. S. D., 2011. Atlas of Histologi with Functional and Clinical Corellations. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Dellmann H.D. and J.A. Eurell. 2006. Textbook of Veterinary Histology. Ed ke-6. USA: Blackwell Publishing.
- Dewi, I., K.W. Astuti, dan N.K. Warditiani. 2013, Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal Farmasi Udayana*
- Dewoto, H.R. 2008. Antikoagulan, Antitrombolitik, Trombolitik dan Hemostatik. In Farmakologi dan Terapi. Edisi V. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Elliott, J. 2007. Staging Kidney Disease. BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology 2nd ed.
- Focosi, D. 2009. Physiology of Adult Homo Sapiens-Urinary Apparatus. [Http://www6.ufrgs.br/favet/imunovet/molecular_immunology/kidney.ht ml](http://www6.ufrgs.br/favet/imunovet/molecular_immunology/kidney.ht ml). (27 Februari 2010).
- Foster TE, B.L. Puskas, B.R. Mandelbaum, M.B. Gerhardt, and S.A. Rodeo. 2009. Platelet-rich plasma: from basic sience to clinical applications. *Am J Sports Med.*; 37(11): 2259-72.
- Francey T. and S. Ariane. 2008. Clinical Epidemiology Of Kindey Disease In the Cat 2. *Veterinary Focus*, 18(2) 2008.

- Ghosh M, K. Pulicherla, V.P.B. Rekha, G. V. Rao, and K. S. Rao. 2012. A Review On Successive Generations Of Streptokinase Based Thrombolytic agents. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 4, suppl 3
- Hertig, A and Rondeau, E. 2004. A Review On Role of the Coagulation/Fibrinolysis System in Fibrin-Associated Glomerular Injury. *J Am Soc nephrol* 15: 844-853.
- Gartner J. P., J.L. Hiatt. 2007. Color Text Book of Histology. 3th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp: 437-45.
- Guyton A. C., Hall J. E. 2008. Ginjal dan Cairan Tubuh. Dalam: Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi XI. Jakarta: EGC, pp 307-9.
- Humes. D, Deborah A. Cieslinski, Terezila M. Coimbra, Joseph M. Messana, and Carlos Galvao. 2017. Epidermal Growth Factor Enhances Renal Tubule Cell Regeneration and Repair and Accelerates the Recovery of Renal Function in Postischemic Acute Renal Failure. Downloaded from <http://www.jci.org> December 25, 2017. <https://doi.org/10.1172/JCI114359>
- Hammerman, Marc R., Robert Safirstein, Raymond C. Harris, F. Gary Toback, and H. David Humes. 2000. Acute renal failure. III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F3–F11,
- Haruenkit, R., S. Poovarodom, H. Leontowicz, M. Leontowicz, M. Sajewcz, T. Kowalska, E. Delgado-Licon, N.E. Rocha-Guzmaan, J.A. Gallegos-Infante, S. Trakhtenberg, dan S. Gorinstein. 2007. Comparative Study of Health Properties and Nutritional Value of Durian, Mangosteen, and Snake Fruit: Experiments In vitro and In vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 5842-9.
- Hutadilok-Towatana, N., W. Reanmongkol, C. Wattanapiromsakul, dan R. Bunkrongcheap. 2010. Acute and Subchronic Toxicity Evaluation of the Hydroethanolic Extract of Mangosteen Pericarp. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4 (10) : 969-74.
- Ho CK, YL. Huang, CC. Chen .2002, Garcinone E, a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines, *Planta Med.*, 68(11):975-979.
- ICUC, 2003, Fruit to the Future Mangosteen, Factsheet, No 8, International Centre for Underutilized Crops.
- Junqueira, L.C.. 2013. Basic Histology Text and Atlas 13th Edition. McGraw-Hill Education. United States. 390-398.

- Jujun, P., K. Pootakham, Y. Pongpaibul, C. Duangrat, dan P. Tharavichitkul, 2008. Acute and Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study of *Garcinia mangostana* Linn. Rind Extract. *CMU. J. Nat. Sci.* 7 (2):199-208
- Jung, H. A., Su, B. N., W.J. Keller, R.G. Metha, dan A.D. Kinghorn. 2006. Antioxidant Xanthones from The Pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J. Agric. Food Chem.* 54: 2077-82
- Kirk, C.A. and M.A. Hickman. 2000. Dietary protein requirement of cats with spontaneous renal disease. *J Vet Intern Med* 2000; 13:351.
- Kosem, N., Y.H. Han, dan P. Moongkarndi. 2007. Antioxidant and Cytoprotective Activities of Methanolic Extract from *Garcinia mangostana* Hulls. *Science Asia.* 33: 283-92.
- Kumar, S & Pandey, A.K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Scientific World Journal.* 2013:162750.
- Kumar, V., K.A. Abbas, and C.J. Aster. 2013. Robbins Basic Pathology Ninth Edition. Elsevier Saunders. Philadelphia. 2-74.
- Kurniawati, A., R. Poerwanto, Sobir, D. Effendi, dan H. Cahyana. 2010. Evaluation of Fruit Characters, Xanthones Content, and Antioxidant Properties of Various Qualities of Mangosteens (*Garcinia mangostana* L.) *J. Agron. Indonesia.* 38 (3): 232 -7
- Kusriningrum. 2008. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kusumawati, D. 2004. Bersahabat Dengan Hewan Coba. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Lakshmi, S. M., U.K. Reddy, dan T.S. Rani. 2012. A Review on Medicinal Plants for Nephroprotective Activity. *Aian Journal of Pharmaceuticaland Clinical Research Vol. 5 Issue 4* 2012: 2
- Levebre S. 2011. Literatur Review – Epidemiology of Feline Chronic Kidney Disease. Banfield Applied Research and Knowledge (BARK) Team.
- Liu, Y. 2006. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69: 213–217, 2006
- Luo, D. D, C. Fielding, A. Phillips and D. Fraser. 2009. Interleukin-1 Beta Regulates Proximal Tubular Cell Transforming Growth Factor Beta-1 Signalling. *Nephrol Dial Transplant* hal. 2655-2665
- Luqmana C., Aulanni'am, dan P. Trisunuwati. 2014. Studi Ekspresi Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) dan Kadang Malondialdehid (MDA) pada

ginjal tikus (*Rattus novergicus*) Hasil Induksi Streptokinase [skripsi]. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.

- Mansour, N. A. A. 2013. Antioxidant Activity of Crude Extract from Mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn) Pericarp on The Lung Rat Wich Exposure by Cigarette [Thesis]. Master of Agriculture Product Technology. Faculty of Agricultural Technology. Brawijaya University.
- Mardiana, L. Tim Penulis PS. 2012. Ramuan dan Khasiat Kulit Manggis. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Masniari Poeloengan dan Praptiwi, 2010. Uji Aktifitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana*). *Media Litbang Kesehatan* 20:65-9.
- Matsumoto, K., Y. Akao, E. Kobayashi, K. Ohguchi, T. Ito, T. Tanaka, M. Iinuma, dan Y. Nozawa. 2003. Induction of Apoptosis by Xanthones from Mangosteen in Human Leukemia Cell Lines. *J. Nat. Prod.* 66: 1124-27.
- Miller, S.D., J.C Russel, H.E. MacInes, J. Abdelkrim, and R.M.Fewster. 2010. Multiple peternity in wild population of invansive *Rattus* species. New Zealand. *Journal of Ecology* 34(3):360-362.
- Moongkarndi, P., N. Kosem, S. Kaslungka, O. Luanratana, N. Pongpan, dan N. Neungton. 2004. Antiproliferation, Antioxidation and Induction of Apoptosis by *Garcinia mangostana* (Mangosteen) on SKBR3 Human Breast Cancer Cell Line. *Journal of Ethnopharmacology*. 90: 161–6
- Nakatani K, N. Nakahata, T. Arakawa, H. Yasuda, Y. Ohizumi. 2002. Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by gamma-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. *Biochem Pharmacol.*, 63(1):73-79.
- Nganlasom, J., T. Suttitum., D. Jirakulsomchok., A. Puapairoj. 2008. Effect of *Centella Asiatica* Linn. Leaves and *Garcinia Mangostana* Linn. Hull on the Healing of Dermal Wounds in Diabetic Rats. *Srinagarind Med J* ; 23(4): 402-407.
- Ngawhirunpat, T., P. Opanasopi, M. Sukma, C.Sittisombut, Atsushikat, dan I. Adachi. 2010. Antioxidant, Free Radical-Scavenging Activity and Cytotoxicity of Different Solvent Extracts and Their Phenolic Constituents from The Fruit Hull of Mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Pharmaceutical Biology*. 48 (1): 55–62
- Nijveld, R. J., E. van Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelans, K. Van Norren, P.A.M van Leeuwen. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanism of

action and potential applications. *American Journal of Clinical and Nutrition* 74:418-425.

- Nugroho, A.E. 2009. Manggis (*Garcinia mangostana*). Dari Kulit Buah yang Terbuang Hingga Menjadi Kandidat Suatu Obat. LABORATORIUM Farmakologi dan Toksikologi. Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Jogjakarta.
- Obolskiy, D., P. Ivo, S. Nisarath, dan H. Michael. 2009. *Garcinia mangostana* L.: A Phytochemical and Pharmacological. <http://www.interscience.wiley.com>. Diakses tanggal 15 Mei 2010.
- Osman, M., A.R. Milan. 2006. Mangosteen- *Garcinia mangostana* L Southampton Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK,
- Pasaribu, F., P. Sitorus, dan S. Bahri. 2012, Uji ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L) terhadap penurunan kadar glukosa darah, *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*, Vol 1 (1), 1-8
- Palakawong, C., P. Sophanodora, S. Pisuchpen, Phongpaichit. 2010. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Crude Extracts from Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Parts and Some Essential Oils. *International Food Research Journal*. 17: 583-9
- Pardede, S.O. 2009. Struktur Sel Streptokokus dan Patogenesis Glomerulonefritis Akut Pasca streptokokus. Jakarta: Departemen Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM.
- Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Orozco-Ibarra, M., dan Pérez-Rojas, J. M. 2008. Medicinal Properties of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Food and Chemical Toxicology*. 46: 3227-39
- Pernefti. 2011. 4th Report of Indonesian Renal Registry. Perkumpulan Nefrologi Indonesia.
- Pongphasuk N, W. Khunkitti, M. Chitcharienthum. 2005. Anti-inflammatory and Analgesic Activities of the Extract from *Garcinia mangostana* Linn. Traditional Medicine % Nutraceuticals, Proc. WOCMAP III.;6
- Ponticelli, C. 2000. Cyclosporine: Nephrologic indications. Yocum De (Ed). Cyclosporine. Clinical application in autoimmune diseases. Philadelphia. Mosby-Wolfe:111-20.
- Pothitirat, W., M.T. Chomnawang, dan W. Grtsanapan. 2010. Free Radical and Anti-Acne Activities of Mangosteen Fruit Rind Extracts Prepared by Different Extraction Methods. *Pharmaceutical Biology*. 48 (2): 182- 6.

- Price, A. Sylvia, dan Wilson, Loraine M., 2012 Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit Edisi 6 Volume 1. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 992
- Rosenfeld, A. J., dan S.M. Dial. 2010. Clinical Pathology for the Veterinary Team. Wiley-Blackwell: 75-90
- Saldariagga B, SA. Pinto SA, LE. Ballesteros. 2008. Morphological Expression of the Renal Artery A Direct Anatomical Study In A Colombian Half-Caste Population. *Int J Morphol.* 26:31-8
- Segev, G.2011. Prognosis of acute renal failure. In: Bartges, J. And Polzin, D. eds. Nephrology and Urology of Small Animals: Blackwell Publishing. In press.
- Sihombing, M dan S.Tuminah. 2011. Perubahan Nilai Hematologi, Biokimia Darah, Bobot Organ dan Bobot Badan Tikus Putih pada Umur Berbeda. *Jurnal Veteriner* vol. 12 No. 1: 58-64.
- Sink, C. A. dan Weinstein, N. M. 2012. Practical Veterinary Urinalysis. UK: John Wiley & Sons, Inc.: 6
- Sinto R, G. Nainggolan. 2010. Acute Kidney Injury: Pendekatan Klinis dan Tata Laksana. Jakarta: Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Slattery, C., E. Campbell, T. McMorrow and P. Michael. 2005. Cyclosporine A-Induced Renal Fibrosis A Role for Epithelial- Mesenchymal Transition. Dublin: University College Dublin.
- Sofna, D.S. 2014. Antioxidant properties of flavonoids. *Med J. Indonesia*, 23(4):239-244.
- Suckow, M. A., Weishbroth, S. H., dan Franklin, C. L. 2006. The Laboratory Rat. USA: Elsevier Academic Press: 110
- Sudoyo A W, Setyohadi B, Alwi I. 2009. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid III Edisi V. Jakarta: Interna Publishing Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam.; 2773-2779
- Suhita, N.L.P.R., I.W. Sudira, dan I.B.O. Winaya. 2013. Histopatologi ginjal tikus putih akibat pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) peroral. *Buletin Veteriner Udayana*. 5(2):71-78.
- Sulyok E. 2004. Acute Proliferative Glomerulonephritis. dalam: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P. Pediatric nephrology. Edisi ke-5. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004.h.601-13.

- Susanto, F.K, A.P.W. Mahendra, and Aulanni'am. 2014. Studi Ekspresi Transforming Growth Factor Beta (TGF-B) dan gambaran histopatologi Ginjal Tikus (*Rattus novergicus*) Model Fibrosis Ginjal Hasil Induksi Streptokinase Pasca Terapi Pemberian Air Rebusan Kacang Kedelai [Skripsi]. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang
- Tao Li, P.K., E.A. Burdman, R.I, Mehta. 2013. Acute kidney injury: Global health alert. *J Nephropathology*. 2(2):90-97
- Tewtrakul S, C. Wattanapiromsakul, W. Mahabusarakam. (2009). Effects of compounds from *Garcinia mangostana* on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells. *J. Ethnopharmacol*. 121: 379-382.
- Tian, Xinrui, Zhuola Liu, Bo Niu, Jianling Zhang, Thian Kui Tan, So Ra Lee, Ye Zhao, Harris C.H David and Zheng Guoping. 2011. E-Cadherin/Beta-Catenin Complex and the Epithelial Barrier. *J.Biomed Biotechnol* 2011:567305.
- Tilley, L. P and F.W.K. Smith. 2011. Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult. Canine and Feline. UK: Blackwell Publishing: 640
- Tjay, Tan Hoan dan Kirana Rahardja. 2007. Obat-obat Penting: Kasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya Ed:VI. Jakarta : PT. Elex Media Komputindo.
- Tortora, Gerard J., Derrickson, Bryan H., 2008. Principles of Anatomy and Physiology. New York: John Wiley & Sons, Inc, 605-611.
- Treuting, Piper M. and Dintzis, Suzanne M. 2012. Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas. Elsevier Inc. USA
- Trihono, P.P. 2011. Peran Transforming Growth Factor Beta-1 Pada Penyakit Ginjal. *Sari Pediatri*, Vol. 13, No. 1, Juni 2011. *Sari Pediatri* 2011;13(1):49-54.
- Tuominen VJ, O. Ylinen, H.J.Helin, and J. Isola. 2016. Free digital image analysis software helps resolve equivocal scores in HER2 immunohistochemistry. *Virchows Arch* 468:191-198.
- Udani, J.K., B.B. Singh, M.L., Barret. And V.J. Singh. 2009. Evaluation Of Mangosteen Juice Blend On Biomarkers Of Inflammation In Obese Subject:A Pilot, Dose Finding Study. *Nutrition Journal*. 8(48):1-7.
- Verma, G.P. 2001. Fundalemtals of Histology. New Age International Publisher. New Delhi.
- Wang, B. 2010. E-cadherin Expression is Regulated by miR-192/215 by a Mechanism of the TGF B. *Diabetes* July 2010 vol 59 no 7. Pp: 1794- 1802.

- Wati, I. P., Aulanni'am dan M. Chanif. 2013. Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Cyclosporine-A. *Kimia Studentjournal*, Vol. 1, No. 2, pp.: 257-263. Universitas Brawijaya Malang
- Watson, D. G. 2009. Analisis Farmasi. Edisi ke-2. Jakarta : EGC. Hal. 372.an
- Weecharangsan, W., P. Opanasopit, M. Sukma, T. Ngawhirunpat, U. Sotanaphun, dan Siripong, P. 2006. Antioxidative and Neuroprotective Activities of 106 Extracts from the Fruit Hull of Mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). *Med. Princ. Pract.* 15: 281–7
- Widiastuti A, Sobir, M.R. Suhartanto. 2010. Diversity analysis of mangosteen (*Garcinia mangostana*) irradiated by gammaray based on morphological and anatomical characteristics. *Nus Biosci* 2: 23-33.
- Winarno, M. W. dan D. Sundari. 2010. Uji Toksisitas Sub Kronik Ekstrak Daun Kembang Sungsang (*Gloriosa super L*) terhadap Fungsi Ginjal Tikus Putih. *Buletin Penelitian Kesehatan* 38 (4): 186-191
- Wresdiyati T, Mamba K, Adnyane IKM, Aisyah US. 2002. The effect of stress condition on the intracellular antioxidant copper, zincsuperoxide dismutase in the rat kidney: an immunohistochemical study. *Hayati* 9:85-88

